

Neue taxonomische Aspekte in der myxobakteriellen Gattung *Sorangium*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Corinna Wolf

aus Celle

1. Referent:	Prof. Dr. Michael Steinert
2. Referent:	Privatdozent Dr. Joachim Wink
eingereicht am:	24.08.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09.04.2018
Druckjahr 2018	

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Landwehr, W., Wolf, C., Wink, J. Actinobacteria and Myxobacteria – Two of the most important bacterial resources für novel antibiotics. In: How to overcome the antibiotic crisis – Facts, challenges, technologies & future perspective (273-302), Stadler M, Dersch P, Current topics in Microbiology and Immunolgy, Springer (2016)

Posterbeiträge

Wolf, C; Nübel, U; Gemperlein, K; Hennessen, F; Wink, J: New taxonomic aspects in the myxobacterial genus *Sorangium*. 2nd Eurpean Conference on Natural Products, Frankfurt am Main, Deutschland (2015)

Wolf, C; Nübel, U.; Gemperlein, K.; Hennessen, F; Kämpfer, P.; Wink, J.: *Sorangium cellulosum*-only one single species? HIPS Symposium, Saarbrücken, Deutschland (2016)

Für Mathilda

Inhalt

II Abkürzungsverzeichnis	IV
III Tabellenverzeichnis.....	VII
IV Abbildungsverzeichnis.....	VIII
V Abstract	XI
VI Zusammenfassung.....	XII
1 Einleitung	1
1.1 Myxobakterien als Hauptproduzenten biologisch aktiver Substanzen	1
1.1.1 Genetisches Potenzial von Myxobakterien.....	6
1.1.2 <i>Sorangium cellulosum</i> als Produzent von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten	6
1.2 Taxonomie der Ordnung Myxococcales	9
1.2.1 Spezies Definition.....	9
1.3 Polyphasische Taxonomie.....	11
1.3.1 Polyphasischer Ansatz zur Aufklärung der Phylogenie der Gattung <i>Sorangium</i>	14
1.4 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Nährmedien und Lösungen.....	17
2.1.2 Chemikalien.....	21
2.1.3 Bakterienstämme	23
2.1.4 Kits.....	26
2.1.5 Geräte.....	26
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Kultivierung der Myxobakterien	28
2.2.1.1 Lyophilisation der Zellmasse aus Flüssigkultur	28
2.2.2 Untersuchung der Rohextrakte auf antimikrobielle Aktivität	29
2.2.2.1 Ernte des Amberlite® XAD®-16N Adsorber Harzes	29
2.2.2.2 Verdünnungsreihe des Extraktes zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität	30

2.2.2.3 Analyse der Rohextrakte mittels HRESIMS.....	32
2.2.3 Matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassen-spektrometer-Detektion und Massenspektrometrie	33
2.2.3.1 Probenvorbereitung für MALDI-TOF/MS	34
2.2.4 Enzymaktivitätstest APIZYM®	34
2.2.5 Fettsäureanalysen.....	37
2.2.5.1 Probenvorbereitung für die FAME Methode	37
2.2.5.2 Analyse der Fettsäuren mittels GC-MS	37
2.2.6 Phospholipidanalyse	38
2.2.6.1 Gewinnung der Biomasse	38
2.2.6.2 Extraktion der Phospholipide.....	38
2.2.6.3 2D-Dünnschichtchromatographie der Phospholipide	39
2.2.6.4 Nachweisreaktionen mittels Sprühreagenzien	40
2.2.7 DNA Isolation.....	43
2.2.7.1 Amplifizierung des 16S rRNA-Gens.....	44
2.2.7.2 Aufreinigung des 16S rRNA Genfragments	47
2.2.7.3 Amplifizierung von <i>xynBI</i>	48
2.2.7.4 Amplifizierung von <i>groELI</i>	49
2.2.7.5 Aufreinigung von <i>xynBI</i> und <i>groELI</i>	51
2.2.7.6 Sequenzierung und Assemblierung von dem 16S rRNA-Gen, <i>xynBI</i> und <i>groELI</i>	51
2.2.7.7 Erstellung phylogenetischer Stammbäume	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Morphologische Untersuchung	52
3.2 Genotypische Analysen.....	57
3.2.1 16S rRNA-Gensequenzvergleich und phylogenetischer Stammbaum	57
3.2.2 Analyse der <i>xynBI</i> -Gensequenzen und phylogenetischer Stammbaum.....	60
3.2.2.1 Definition phylogenetischer Klagen und putativer Typstämme	62
3.2.2.2 Übertragung der nach <i>xynBI</i> definierten Klagen auf den phylogenetischen Stammbaum auf Basis des 16S rRNA-Gens.....	65
3.2.2.3 Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen der putativen Typstämme untereinander.....	67
3.2.3 Analyse der <i>groELI</i> Gensequenzen und phylogenetischer Stammbaum	68
3.2.3.1 Übertragung der nach <i>xynBI</i> definierten Klagen auf den phylogenetischen Stammbaum auf Basis von <i>groELI</i>	70
3.2.4 Morphologisches Erscheinungsbild innerhalb der definierten Klagen.....	72
3.3 APIZYM® Enzymaktivitätstest	73

3.3.2 N-acetyl- β -Glukosaminidase-Aktivität der definierten Kladen	74
3.4 MALDI-TOF/MS zur Bestimmung von myxobakteriellen Arten	76
3.5 DNA-DNA-Hybridisierung als Basis der polyphasischen Taxonomie.....	78
3.6 Biologisch aktive Substanzen der Typstämme.....	80
3.6.1 Ergebnisse des Serienverdünnungstests	80
3.6.2 Detektion der Sekundärmetaboliten der putativen Typstämme mittels HRESIMS	82
3.7 Fettsäureanalyse	83
3.8 Phospholipidprofile der 15 putativen Typstämme	88
3.8.1 Nachweise der Gesamtlipide mit Molybdätophosphorsäure	88
3.8.2 Ninhydrin-Nachweis der Lipide mit freier Aminogruppe	90
3.8.3 Nachweis der Phospholipide mit dem Dittmer-Lester-Reagenz	92
4 Diskussion	94
4.1 Unterteilung der Gattung <i>Sorangium</i> in unterschiedliche Spezies auf Basis der Morphologie	95
4.1.1 Unterteilung der Gattung <i>Sorangium</i> auf Basis der polyphasischen Taxonomie.....	99
4.1.1.1 Phylogenetische Stammbäume auf Basis des <i>16S rRNA</i> -, <i>xynBI</i> - und <i>groELI</i> -Gens	99
4.1.1.2 Enzymaktivitätsbestimmung mittels APIZYM®	100
4.1.1.3 MALDI-TOF/MS Analyse.....	100
4.1.1.4 DNA-DNA-Hybridisierung	101
4.1.1.5 Serienverdünnungstests und Bestimmung der biologisch aktiven Substanzen ..	102
4.1.1.6 Fettsäureanalyse	103
4.1.1.7 Phospholipidanalyse	104
4.1.2 Neu definierte Spezies	106
4.2 Vergleich der angewandten Methoden im Hinblick auf die taxonomische Auflösung ...	107
5. Ausblick.....	110
6. Literaturverzeichnis.....	111
7. Danksagung.....	121

II Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Celsius
C	Cytosin
cm	Zentimeter
DC	Dünnschicht-Chromatografie
dest.	destilliert
DHA	<i>docohexanoic acid</i> , Docohexaensäure
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i> , Desoxiribunukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii (lat)</i> , und andere (dt)
EPA	<i>eicosaopentaenoic acid</i> , Eicosaopentaensäure
ESI-TOF-MS	<i>electrospray ionisation time of flight mass spectrometry</i>
FAME	<i>fatty acid methylesters</i> , Fettsäuremethylester
Fe	Eisen
g	Gramm
G	Guanin
GC-MS	Gaschromatografie mit Massenspektrometrie
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIPS	Helmholtz Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland

H ₂ O	Wasser
HOG-Signalweg	<i>high osmolarity glycerol</i> Signalweg
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRESIMS	<i>high resolution electro spray ionization mass spectrometry</i> , hochauflösende Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
JSRM	JumpStart™ ReadyMix™
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
L	Liter
LC-MS	<i>liquid chromatography – mass spectrometry</i> , Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
M	Molar
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i> Matrix assistierte Laser Desorption Ionisierung mit Flugzeitanalyse
MeOH	Methanol
MHB	Müller-Hinton Broth
MIC	<i>minimal inhibition concentration</i> , minimale Hemm-Konzentration
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
MISG	Arbeitsgruppe Mikrobielle Stammsammlung
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie

MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Normal
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NH ₄ HCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
o. A.	ohne Angabe
OAG	1- Oleoyl- 2 Acetyl-sn-Glycerol
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potential of hydrogen</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
pmol	picomol
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäure
RNA	<i>ribonucleinacid</i> , Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phased</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde
Soce	<i>Sorangium cellulosum</i>
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA Puffer
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
zw.	zwischen

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Relevante, biologisch aktive Sekundärmetabolite von Myxobakterien und deren Wirkmechanismus (Landwehr <i>et al.</i> 2016)	4
Tabelle 2 In dieser Arbeit untersuchte Isolate von <i>S. cellulorum</i>	23
Tabelle 3 Pathogene Teststämme für den Bioaktivitätstest Test	25
Tabelle 4 Auflistung der Medien und Inkubationstemperaturen für die Teststämme des Bioaktivitätstests	31
Tabelle 5 Nachweisspektrum des APIZYM® Enzymtests	35
Tabelle 6 Farbnachweis der Phospholipide	43
Tabelle 7 Primer für die PCR des 16S rRNA-Gens	45
Tabelle 8 PCR-Programm für die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens	46
Tabelle 9 Primersequenzen für die Amplifikation von <i>xynB1</i>	48
Tabelle 10 PCR-Programm für die Amplifizierung von <i>xynB1</i>	49
Tabelle 11 Primersequenzen für die Amplifikation von <i>xynB1</i>	50
Tabelle 12 PCR-Programm für die Amplifizierung von <i>groEL1</i>	50
Tabelle 13 Zuordnung der Typstämme zu den Kladen A-O	64
Tabelle 14 Prozentuale Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen.....	67
Tabelle 15 Koloniefärbung der untersuchten Stämme von <i>S. cellulorum</i>	72
Tabelle 16 Stämme mit und ohne N-acetyl- β -Glukosaminidase Aktivität.....	74
Tabelle 17 Hemmintensität der Typstämme gegenüber den Testorganismen.....	80
Tabelle 18 Sekundärmetaboliten der Typstämme	83
Tabelle 19 Fettsäureprofile der definierten Typstämme.....	84
Tabelle 20 Namensvorschläge für die neu definierten Spezies	107

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Taxonomie der Ordnung Myxococcales	1
Abbildung 2 A: Fruchtkörper von <i>Stigmatella aurantiaca</i> ; B: Vegetative Zellen von <i>Myxococcus virescens</i> ; C und D: Wachstum und Schwarmformation von <i>S. cellulosum</i> ; E: Lichtbrechende Myxosporen von <i>S. cellulosum</i>	2
Abbildung 3 A: Fruchtkörper von Soce 1128 (grüner Pfeil); B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Sporangiolen von Soce 1128 (rote Pfeile).....	3
Abbildung 4 Prozentualer Anteil der myxobakteriellen Gattungen an produzierten biologisch aktiven Sekundärmetaboliten (modifiziert nach Gerth et al. 2003)	7
Abbildung 5 Anzahl der validierten, neuen Gattungen und Spezies zwischen den Jahren 1980 und 2013 (Oren und Garrity 2014).....	10
Abbildung 6 Ablauf der Charakterisierung und Beschreibung einer neuen, prokaryotischen Spezies (modifiziert nach Rainey 2011)	12
Abbildung 7 Ablauf der Analyse zur Taxonomie von <i>Sorangium</i>	16
Abbildung 8 Schematische Darstellung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte	31
Abbildung 9 Schematische Darstellung einer MALDI-TOF Analyse (Schubert <i>et al.</i> 2010) ..	34
Abbildung 10 Auswertungstabelle für den Nachweis der jeweiligen Enzymaktivitäten.....	36
Abbildung 11 Schematische Darstellung einer Kieselgelplatte und Laufrichtungen der Lösemittel.....	40
Abbildung 12 Nachweis der Gesamtlipide mit Molybdatophosphorsäure	41
Abbildung 13 Ninhydrin-Nachweis.	41
Abbildung 14 Nachweis der Phosphatgruppen mit dem Dittmer-Lester-Reagenz.....	42
Abbildung 15 Nachweis der organischen Moleküle	42
Abbildung 16 Herkunft der untersuchten Stämme der Gattung <i>Sorangium</i> in Prozent.....	52
Abbildung 17 Wachstum von <i>Sorangium</i> auf VY/2.	53
Abbildung 18 Wachstum der Stämme Soce 134, Soce 204 und Soce 1826 auf P Medium. ..	54
Abbildung 19 Wachstum von <i>Sorangium cellulosum</i> auf Stan21 Medium	54
Abbildung 20 Wachstum von <i>S. cellulosum</i> auf VY/2	55
Abbildung 21 Wachstum von Soce 1097 auf unterschiedlichen Medien	56
Abbildung 22 Agarosegel mit dem PCR-Produkt 16S rRNA-Gen.....	57
Abbildung 23 Phylogenetischer Baum (maximum-likelihood) auf Basis der 16S rRNA- Gensequenzen.....	59

Abbildung 24 Maximum-likelihood Baum auf Basis der <i>xynB1</i> -Gensequenzen der 73 untersuchten Stämme der Gattung <i>Sorangium</i>	61
Abbildung 25 Maximum-likelihood Baum auf Basis der <i>xynB1</i> -Gensequenzen der 73 untersuchten Stämme der Gattung <i>Sorangium</i>	63
Abbildung 26 Phylogenetischer Baum (maximum-likelihood) auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen.....	66
Abbildung 27 Phylogenetischer Baum (maximum-likelihood) auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen.....	69
Abbildung 28 Maximum-Likelihood Baum der 73 <i>Sorangium</i> Stämme auf Basis der <i>groEL1</i> -Sequenzen.....	71
Abbildung 29 APIZYM® Teststreifen des neu definierten Typstamms GT47 ohne Aktivität der N-acetyl- β -Glukosaminidase (A) im Vergleich mit dem neu definierten Typstamm 1826 mit N-acetyl- β -Glukosaminidase Aktivität (B).....	73
Abbildung 30 Phylogenetischer Baum auf Basis von <i>xynB1</i> . Die roten Markierungen zeigen die fehlende Aktivität der N-acetyl- β -Glukosaminidase an.	75
Abbildung 31 MALDI-TOF Dendrogramm der 73 untersuchten Stämme der Gattung <i>Sorangium</i>	77
Abbildung 32 Hybridisierungswerte der putativen Typstämme in Prozent.....	79
Abbildung 33 Serienverdünnungstest der 15 putativen Typstämme	81
Abbildung 34 Hauptchromatogramm und UV-Chromatogramm des Rohextraktes des Stammes Soce 1871.	82
Abbildung 35 Heatmap der Fettsäureprofile der Typstämme.....	87
Abbildung 36 Nachweis der Gesamtlipide mit Molybdätophosphorsäure.	89
Abbildung 37 Nachweis der aminohaltigen Phospholipide mit Ninhydrin	91
Abbildung 38 Individuelle Phospholipidmuster der Stämme Soce 1000, Soce 176 und Soce 1335.....	92
Abbildung 39 Phospholipidmuster der 15 untersuchten Typstämme	93
Abbildung 40 Darstellung der hohen Similarität der Sequenz des <i>xynB1</i> -Gens (oben) und der Sequenz des 16S rRNA-Gens (unten)	96
Abbildung 41 Phänotypisches Erscheinungsbild der Stämme Soce 1871 und Soce 341 auf VY/2 Nährmedium. A und B: Soce 341; C und D: Soce 1871	97
Abbildung 42 Phänotypisches Erscheinungsbild der Stämme Soce 281 und Soce 764 auf VY/2 Nährmedium.	98

Abbildung 43 Vergleich der Hybridisierungswerte der DDH (grau) mit 16S rRNA - Gensequenzhomologie (blau).....	101
Abbildung 44 Gegenüberstellung der Gesamtlipid- und Phospholipidprofile der Stämme Soce 1014 und Soce 176.	105
Abbildung 45 Schematische Darstellung der taxonomischen Auflösung unterschiedlicher Methoden zur phylogenetischen Einordnung.....	108

V Abstract

Myxobacteria are, next to Actinobacteria, the main producers of biological active secondary metabolites. Members of the genus *Sorangium* produce a large spectra of different natural products, like epothilones. The epothilone derivate ixabepilone is used in medicine against different types of breast cancer. Since the 1970's, the hypothesis exists, that the genus *Sorangium* can be spread in different, distinct species next to the existing and validated species *S. cellulosum*. To substantiate this hypothesis, this work includes a polyphasic approach. For the taxonomic categorisation of the genus *Sorangium*, phenotypic, genotypic and chemotypic markers were analysed. Therefore, 72 randomised collected strains from the strain collection of the Helmholtz Center for Infection Research and the validated type strain Soce 1871 were used. After the creation of phylogenetic trees referring to the sequences of the 16S rRNA Gene, the cellulase gene and a chaperon gene, the strains were separated in 15 clades.

On the one hand, the dendrogram of an implemented MALDI-TOF/MS analysis didn't match completely with the division of the phylogenetic trees. On the other hand, the analysis of the enzymatic activities confirmed the demarcation of the clades to each other. Furthermore, a classification based on the colour of the fruiting bodies an colonies was not possible. A putative type strain for each clade was defined, which showed most of the characteristics typically of its clade. These potential type strains were used for DNA-DNA-hybridisation against the type strain Soce 1871. Additionally, the pattern of the phospholipids and the fatty acid were analysed. Also the individual composition of biologically active secondary metabolites for each strain were determined. In the end, the set of different methods gave instance of the spreading of *S. cellulosum* in different species. The border strains Soce 1014, Soce 1078, Soce 1128 and Soce 1335 need to be analysed with supplementally methods like automatically ribotyping via Riboprinter®. Also determining of the average nucleotide identity, based on the full genome sequence, could be an useful method to finally clarify the relationships between the strains.

VI Zusammenfassung

Myxobakterien zählen, neben den Actinobakterien, zu den Hauptlieferanten biologisch aktiver Sekundärmetabolite. Insbesondere die Gattung *Sorangium* produziert eine Vielzahl an unterschiedlichen Naturstoffen, darunter das, in Form des Derivats Ixabepilon in der Medizin gegen Brustkrebs angewandte, Epothilon. Seit den 1970er Jahren hält sich die Hypothese, dass sich die einzige, validierte Spezies innerhalb dieser Gattung, *Sorangium cellulosum*, in mehrere, distinkte Spezies unterteilen lässt. Um eine solche Unterteilung zu untermauern, wurde in dieser Arbeit ein polyphasischer Ansatz angewendet. Für die taxonomische Kategorisierung der Mitglieder der Gattung *Sorangium*, wurden phenotypische, genotypische und chemotypische Merkmale analysiert. Hierfür wurden 72, aus der Stammsammlung des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung randomisiert entnommene Stämme, sowie der validierte Typstamm der Art *S. cellulosum*, Soce 1871, verwendet. Nach der Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen auf Basis des 16S rRNA-Gens, eines Zellulase-Gens sowie eines Chaperon-Gens, konnten die Stämme insgesamt 15 definierten Kladen zugeordnet werden. Die durchgeführte MALDI-TOF/MS Analyse mit dem daraus entstandenen Dendrogramm spiegelte nur bedingt die Kladenburgung der phylogenetischen Stammbäume wieder, wohingegen eine Untersuchung der Enzymaktivität die Abgrenzung der Kladen zueinander bestätigte. Eine Einteilung der Stämme aufgrund der morphologischen Eigenschaften wie Kolonie- und Fruchtkörperfärbung konnte ausgeschlossen werden. Es wurde für jede Klade ein Typstamm bestimmt, welcher möglichst viele Merkmale der Stämme innerhalb der jeweiligen Klade widerspiegelte. Mit den ausgewählten, putativen Typstämmen wurde eine DNA-DNA-Hybridisierung gegen den Typstamm Soce 1871 durchgeführt. Für die weitere Charakterisierung der Stämme wurden ebenfalls die Fettsäure- und Phospholipidmuster analysiert. Zusätzlich wurde bestimmt, welche bekannten, biologisch aktiven Sekundärmetabolite diese Stämme produzieren. Das Set an den ausgewählten, unterschiedlichen Methoden bot ausreichende Belege, dass es sich bei den putativen Typstämmen um unterschiedliche Spezies handelt. Bei den grenzwertigen Ergebnissen bezogen auf die Stämme Soce 1014, Soce 1078, Soce 1128 und Soce 1335 müssen weitere Methoden, wie das automatische Ribotyping mittels Riboprinter, oder die, auf der Vollgenomsequenz basierende, Analyse der durchschnittlichen Nukleotidsequenz, die Artzugehörigkeit bestätigen.

1 Einleitung

1.1 Myxobakterien als Hauptproduzenten biologisch aktiver Substanzen

Das erste Myxobakterium wurde im Jahr 1809 vom deutschen Botaniker Heinrich Friedrich Link entdeckt und mit dem Namen *Polyangium vitellinum* versehen. Aufgrund des pilzähnlichen Lebenszyklus der Zellen wurde das Bakterium jedoch fälschlicherweise als Pilz charakterisiert (Link 1809). Erst im Jahre 1892 wurden diese Organismen von Roland Thaxter in die Domäne der Bakterien eingeordnet (Thaxter 1892). Nach dem aktuellen Stand der Forschung besteht die Ordnung der Myxococcales derzeit aus 58 beschriebenen und validierten Spezies, welche in 29 Gattungen eingruppiert sind (Landwehr und Wolf 2016) (Abb. 1). Die Gattung *Vitiosangium* mit den Spezies *Vitiosangium subalbum* und *Vitiosangium cumulatum* wurde erst kürzlich beschrieben (Awal *et al.* 2017), ebenso wie die Spezies *Racemicystis iranesis* (Wink *et al.* 2017).

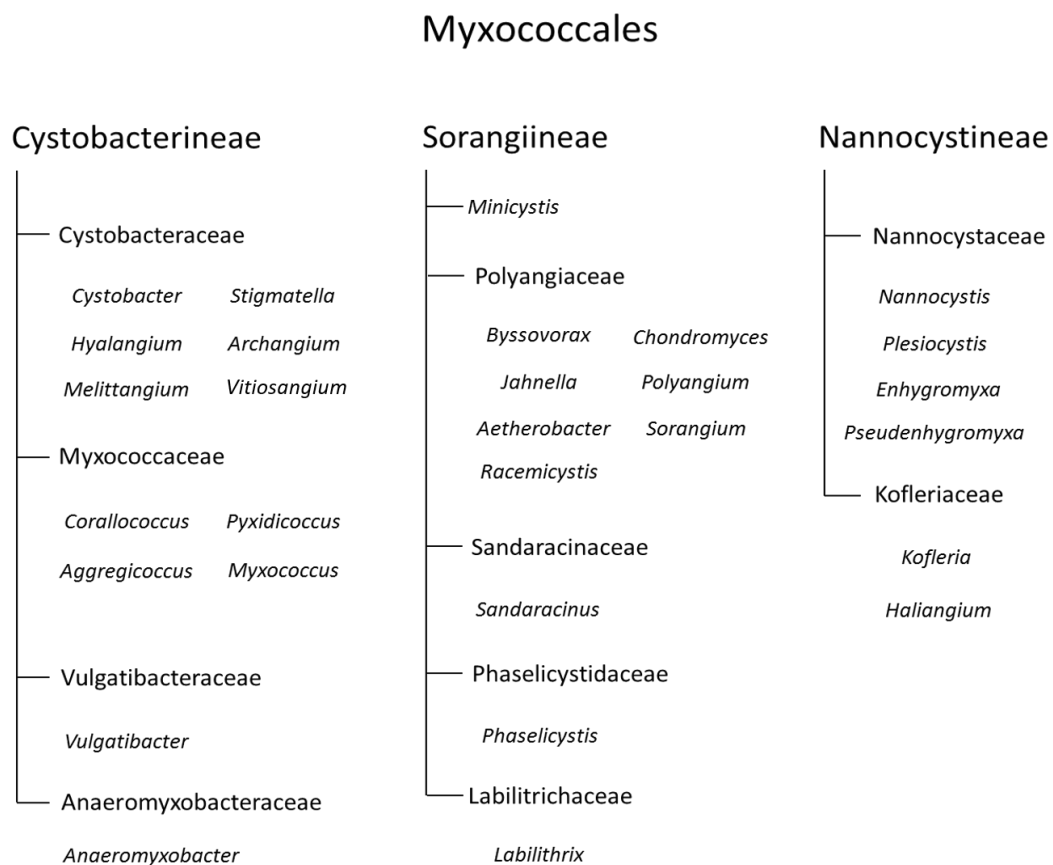


Abbildung 1 Taxonomie der Ordnung Myxococcales (modifiziert und aktualisiert nach Landwehr *et al.* 2016).

Myxobakterien sind Gram-negativ und gehören zu den Deltaproteobakterien. Die vegetativen Zellen sind stäbchenförmig und besitzen die Fähigkeit, über feste Oberflächen zu gleiten, um auf der Suche nach Energiequellen auszuschwärmen (Abb. 2 B, C, D). Liegt ein Mangel an Nährstoffen in der Umgebung vor, sind die Zellen in der Lage, eine Art multizellulären Fruchtkörper zu bilden (Reichenbach *et al.* 1988) (Abb. 2 A). Solche Fruchtkörper, einzigartig in der Welt der Bakterien, können bis zu 10^5 trockenheitsresistente Myxosporen (Abb. 2 E) enthalten und unterscheiden sich bezüglich ihrer Höhe, Form und Farbe maßgeblich zwischen den unterschiedlichen Gattungen und Arten (Reichenbach 1983, Garcia und Müller 2014).

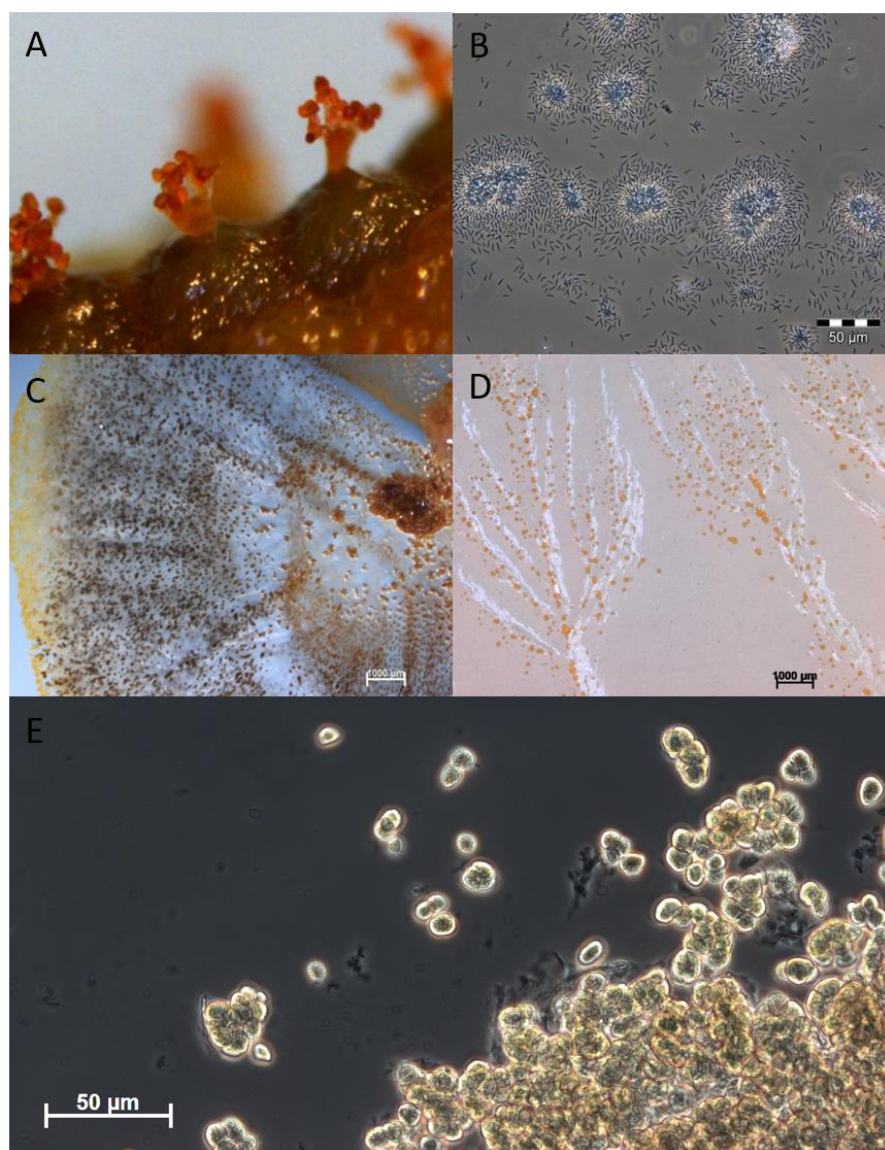


Abbildung 2 A: Fruchtkörper von *Stigmatella aurantiaca* ; B: Vegetative Zellen von *Myxococcus virescens*; C und D: Wachstum und Schwarmformation von *S. cellulosum*; E: Lichtbrechende Myxosporen von *S. cellulosum* (A und B: Birte Trunkwalter, AG MISG HZI Braunschweig (2015); C, D und E: Corinna Wolf, AG MISG HZI Braunschweig (2015)).

Die Myxosporen im Inneren der Fruchtkörper sind, im Gegensatz zu der vegetativen Zellform, verkürzt, lichtbrechend und häufig in sogenannte Sporangien eingebettet (s. Abb. 3).

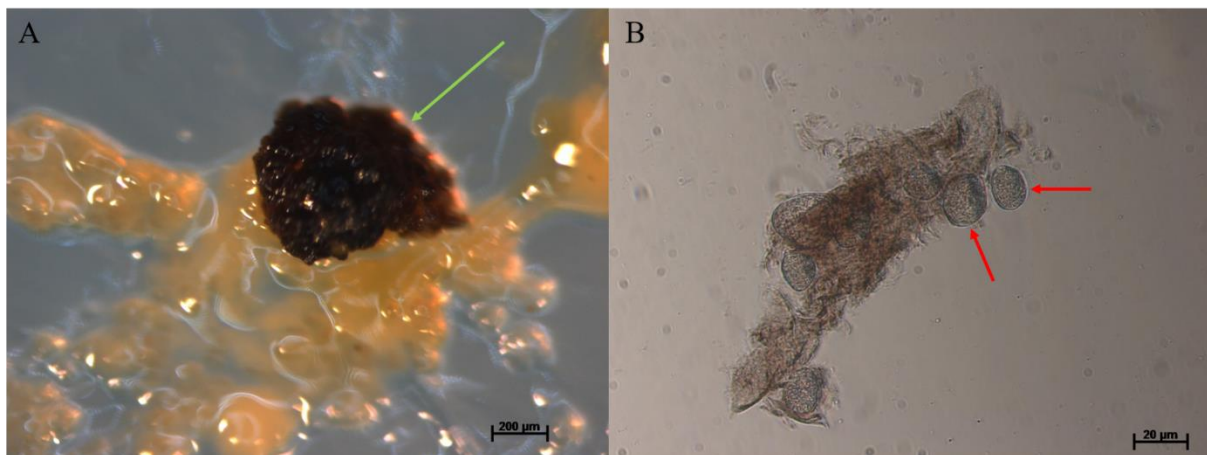


Abbildung 3 A: Fruchtkörper von Soce 1128 (grüner Pfeil); B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Sporangien von Soce 1128 (rote Pfeile) (Corinna Wolf, AG MISG HZI Braunschweig (2016)).

Aufgrund ihrer Eigenschaft, extreme Trockenheit unbeschadet zu überdauern, können Myxosporen mehrere Jahre unter nährstoffarmen Bedingungen in der Umwelt überleben (Reichenbach 2006). Zu den natürlichen terrestrischen und marinen Habitaten von Myxobakterien gehören unterschiedlichste Substrate wie zum Beispiel Erde, verrottendes Holz und Meerwasser. Myxobakterien ernähren sich räuberisch von anderen Mikroorganismen. Die Gattungen *Sorangium* und *Byssovorax* sind zudem in der Lage, durch die Sezernierung von zellulolytischen Exoenzymen Zellulose zu zersetzen und so für ihren Energiestoffwechsel verwertbar zu machen (Reichenbach *et al.* 1988, Reichenbach *et al.* 2006).

Im Jahre 1946 stieg das wissenschaftliche Interesse an den Myxobakterien schlagartig an, als entdeckt wurde, dass ein Stamm der Art *Myxococcus virescens* einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum des humanpathogenen Bakteriums *Staphylococcus aureus* zeigte (Oxford und Singh 1946, Oxford 1947). Myxobakterien sind mittlwerweile, neben den Actinobakterien, verschiedenen *Bacillus* Arten, Pseudomonaden und Pilzen, bekannt für die Produktion einer Vielfalt an unterschiedlichen Sekundärmetaboliten. Besonders Substanzen mit antibiotischen, antimykotischen und/ oder zytostatischen Eigenschaften sind interessant für die Erforschung und Entwicklung neuartiger Arzneistoffe und Antibiotika sowie von Pflanzenschutzmitteln. Die Fähigkeit zur Produktion einer großen Bandbreite an biologisch aktiven Naturstoffen liegt wahrscheinlich dem natürlichen Konkurrenzdruck durch verschiedene Organismen in den

unterschiedlichen Habitaten zugrunde. Die Gattung *Sorangium* muss sich, um an das Substrat Zellulose zu gelangen, gegen die ebenfalls zelluloseverwertenden Pilzarten durchsetzen, wohingegen die proteolytischen Bakterien sich selbst, sowie das organische Material gegen andere Bakterien- sowie Pilzarten verteidigen müssen (Gerth *et al.* 2003).

Neben der Verwendung als Antibiotika und Antimykotika in der Human- und Veterinärmedizin, zeigen die biologisch aktiven Substanzen ebenfalls antiparasitäre, antivirale und krebshemmende Wirkungen. Auch antidiabetische, blutdrucksenkende, antihypercholesterolemische, insulin-sensibilisierende und immunregulatorische Wirkungen sowie ein Effekt gegen Plasmodien, die Malariaerreger, konnten bereits gezeigt werden. Für ihre zytotoxische und antimikrobielle Aktivität bekannte Substanzen, aus *S. cellulosum* stammend, sind Epothilon A und Epothilon B (Gerth *et al.* 1996). Seit dem Jahr 2007 wird ein semisynthetisches Epothilon-Derivat, das Ixabepilon (Ixempra®), erfolgreich zur Bekämpfung von Brustkrebs in verschiedenen Stadien eingesetzt (Reichenbach und Höfle 2008).

In der Industrie finden die biologisch aktiven Substanzen aus Myxobakterien vor allem als Insektizide, Akarizide und Herbizide Anwendung (Grabley und Thiericke 1999, Schreurs *et al.* 2009, Berod *et al.* 2014, Weissmann und Müller 2009). Eine, für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie interessante, Eigenschaft der Myxobakterien ist die signifikante Produktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) wie die, für den humanen Stoffwechsel bedeutsamen, Omega-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (*eicosaopentaenoic acid*, EPA) und Docosahexaensäure (*docosahexa-enic acid*, DHA) (Garcia *et al.* 2011, Gemperlein *et al.* 2016). Die Tabelle 1 zeigt eine Auflistung einiger relevanter, biologisch aktiver Substanzen von Myxobakterien sowie deren Wirkweise.

Tabelle 1 Relevante, biologisch aktive Sekundärmetabolite von Myxobakterien und deren Wirkmechanismus (Landwehr *et al.* 2016)

Substanz	Aktivität	Wirkmechanismus	Spezies	Referenz
Ambruticin	antimykotisch	Interferiert mit HOG-Signalweg	<i>S. cellulosum</i>	Ringel <i>et al.</i> (1977); Connor <i>et al.</i> (1977)
Aurachine	antibakteriell	Inhibieren NADH Oxidation	<i>S. aurantiaca</i>	Kunze <i>et al.</i> (1987)
Chondramide	antimykotisch/ zytostatisch	Interferieren mit Aktinpolymerisation	<i>C. crocatus</i>	Kunze <i>et al.</i> (1995)

Crocacin	antibakteriell	Inhibiert Elektronentransport	<i>C. crocatus</i>	Kunze <i>et al.</i> (1994)
Cystobactamide	antibakteriell	Inhibieren Typ II Topoisomerase	<i>Cystobacter sp.</i>	Baumann <i>et al.</i> (2014)
Cystothiazol	antimykotisch/ zytostatisch	Inhibiert submitochondrielle NADH oxidation	<i>C. fuscus</i>	Ojika <i>et al.</i> (1998)
Disciformycine	antibakteriell	o. A.	<i>P. fallax</i>	Surup <i>et al.</i> (2014)
Epothilone	zytotoxisch	Inhibieren Mikrotubulifunktion	<i>S. cellulorum</i>	Gerth <i>et al.</i> (1996)
Etnangien	antibakteriell	Inibiert Nukleinsäurepolymerasen	<i>S. cellulorum</i>	Irschik <i>et al.</i> (2007)
Melithiazole	antibakteriell	Inhibieren NADH Oxidation	<i>M. lichenicola,</i> <i>A. gephyra,</i> <i>M. stipitatus</i>	Sasse <i>et al.</i> (1999)
Myxothiazol	antimykotisch	Inhibiert Elektronentransport	<i>M. fulvus</i>	Gerth <i>et al.</i> (1980)
Myxovalargin	antibakteriell	Inhibiert Proteinbiosynthese und schädigt Zellmembranen	<i>M. fulvus</i>	Irschik <i>et al.</i> (1983) Irschik <i>et al.</i> (1985)
Myxovirescin	antibakteriell	Inhibiert Signalpeptide	<i>M. virescens</i>	Gerth <i>et al.</i> (1982)
Rhizopodin	zytostatisch	Veränderung der Proteinphosphorylierung	<i>M. stipitatus</i>	Sasse <i>et al.</i> (1993)
Ripostatin	antibakteriell	Inhibiert RNA Polymerase	<i>S. cellulorum</i>	Irschik <i>et al.</i> (1995)
Sorangicin	antibakteriell	Inhibiert RNA Polymerase	<i>S. cellulorum</i>	Irschik <i>et al.</i> (1987)
Soraphene	antimykotisch, antiviral, hemmend auf caneroide Zellen, immunregulatorisch, insulin-sensibilisierend	Inhibieren Acetyl-CoA Carboxylase	<i>S. cellulorum</i>	Gerth <i>et al.</i> (1994) Schreurs <i>et al.</i> (2009) Martinez <i>et al.</i> (2013) Berod <i>et al.</i> (2014) Corominas-Faja <i>et al.</i> (2014) Koutsoudakis <i>et al.</i> (2015)
Stigmatellin	antibakteriell	Inhibiert Elektronentransport	<i>S. aurantiaca</i>	Kunze <i>et al.</i> (1984)

1.1.1 Genetisches Potenzial von Myxobakterien

Die Genome von Myxobakterien zählen bisher zu den größten Genomen innerhalb des Reichs der Bakterien. So besteht beispielsweise das Genom des *Sorangium* Isolates Soce 56 aus mehr als 13033779 Basenpaaren mit siebzehn Sekundärmetabolit Gen-Clustern (Schneiker *et al.* 2007) und das Genom von *M. xanthus* beinhaltet mindestens 9,14 Millionen Basenpaare (Goldmann *et al.* 2006). Als Begründung für diese enorme Größe wird der komplexe Lebenszyklus der Myxobakterien angeführt. Im Gegensatz zu anderen Bakterien benötigen Myxobakterien eine weitaus komplexere Zusammensetzung des Genoms, um ihr spezielles Sozialverhalten, wie Schwärmen und Fruchtkörperbildung, umzusetzen. Aus diesem Grund wird den ubiquitär vorkommenden Myxobakterien eine hohe Kapazität hinsichtlich der noch unentdeckten, biologisch aktiven Sekundärmetabolite zugeschrieben. Das genetische Potenzial eines Stammes ist allein mit phänotypischen und biochemischen Analysen schwer zu definieren, da aufgrund der angewendeten Extraktions- und Detektionsmethoden eine Vielzahl an Metaboliten nicht bestimmt werden können (Wenzel und Müller 2009). Es bietet sich daher an, gezielt nach Gen-Clustern für Sekundärmetabolite zu suchen, sowie die Vollgenomsequenz eines Stammes zu bestimmen und zu analysieren. Diese Informationen können genutzt werden, um, mit Hilfe gentechnischer Manipulationsmethoden, die Produktion bestimmter Substanzen zu erhöhen, sowie die Aktivierung von nicht translatierten Genen, den sogenannten „stillen“ Genen, zu induzieren (Müller und Wink 2014).

1.1.2 *Sorangium cellulosum* als Produzent von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten

Der Durchbruch in der Entdeckung von myxobakteriellen, antibiotischen Substanzen gelang im Jahr 1977, als die komplette chemische Struktur des antimykotischen Moleküls Ambruticin, produziert von einem *S. cellulosum* Stamm, aufgeklärt werden konnte (Connor *et al.* 1977, Ringel *et al.* 1977). Angehörige dieser Gattung unterscheiden sich, neben Vertretern der Gattung *Byssovorax*, von anderen Myxobakterien, durch ihre Fähigkeit, Zellulose mit Hilfe unterschiedlicher Exoenzyme zu zersetzen und somit für ihren Energiestoffwechsel nutzbar zu

machen (Reichenbach *et al.* 1988). Innerhalb der letzten Jahrzehnte konnte gezeigt werden, dass Angehörige der Gattung *Sorangium* ein besonders großes Potenzial für die Synthese von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten besitzen. Mehr als 48 % der von Myxobakterien stammenden, aktiven Verbindungen können der Gattung *Sorangium* zugeordnet werden (Gerth *et al.* 2003) (s. Abb. 4).

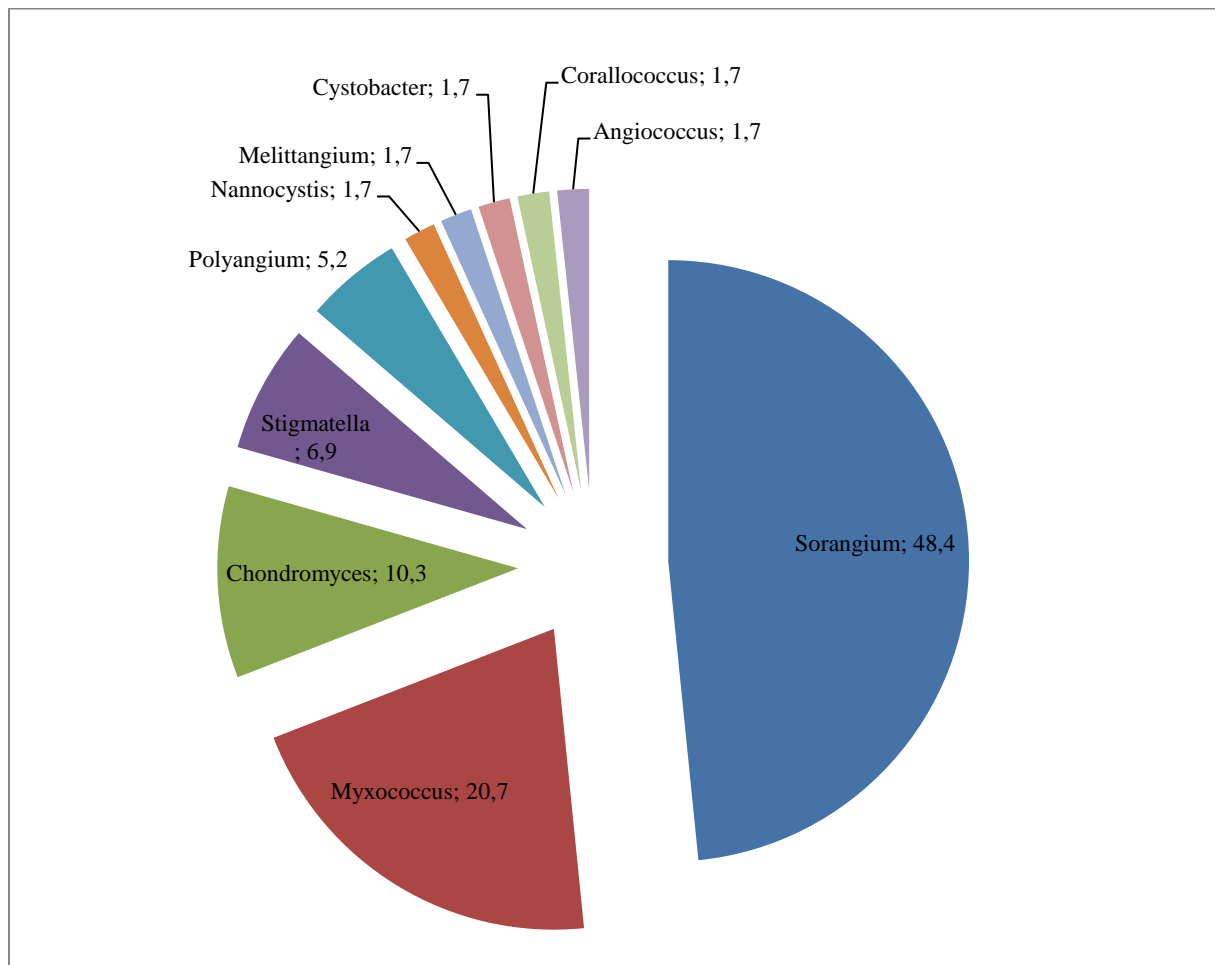


Abbildung 4 Prozentualer Anteil der myxobakteriellen Gattungen an produzierten biologisch aktiven Sekundärmetaboliten (modifiziert nach Gerth *et al.* 2003).

Derzeit gibt es nur eine einzige beschriebene und validierte Art innerhalb der Gattung *Sorangium*, obwohl es in der Literatur viele Hinweise gibt, dass die Gattung in mehrere unterschiedliche Arten unterteilt werden kann (Reichenbach 2006, Shimkets *et al.* 2004, Jiang *et al.* 2008, Lee *et al.* 2013).

Die klassische Taxonomie der Myxobakterien basiert hauptsächlich auf der rein morphologischen Charakterisierung der Stämme, sowie den Sequenzunterschieden des 16S

rRNA-Gens (Reichenbach und Dworkin 1991). Es konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass die morphologische Klassifizierung, basierend auf der Farbe und Form der Kolonien und Fruchtkörper, sowie den phänotypischen Eigenschaften des Schwarms, zu keiner eindeutigen Zuordnung in eine der vorgeschlagenen Untergruppen der Sorangien führt (Yan *et al.* 2003). Lediglich die Form der Sporangien, polyedrisch oder kugelförmig, unterstützen die hypothetischen Kladen der Untergruppen basierend auf den 16S rRNA-Gensequenzen (Yan *et al.* 2003).

Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien, wird in dieser Arbeit ein polyphasischer, taxonomischer Ansatz angewendet, der unterschiedliche Daten aus phänotypischen, genotypischen und phylogenetischen Analysen kombiniert. Insgesamt werden 73 *Sorangium* Stämme charakterisiert und in unterschiedliche Arten aufgeteilt, obwohl die evolutionäre Distanz zwischen den 16S rRNA-Gensequenzen der untersuchten Stämme die Grenze von 3 % zur Definierung einer neuen Art nicht überschreitet (Colwell 1970, Vandamme *et al.* 1996). In der Literatur wurde jedoch bereits gezeigt, dass die 16S rRNA Gensequenz von Sorangien, trotz der geringen Unterschiede, eine Eingruppierung der Stämme in unterschiedliche phylogenetische Kladen ermöglicht, die dann, unter Anwendung zusätzlicher Methoden, bestätigt werden müssen (Lee *et al.* 2010, Lee *et al.* 2012, Li *et al.* 2013).

Die DNA-DNA-Hybridisierung (DDH) hat eine hohe taxonomische Auflösung und ist ein geeignetes Instrument, um die gängige Annahme zu entkräften, dass sich allein aufgrund der 16S rRNA-Gensequenz die Spezies bestimmen ließe (Fox *et al.* 1992). Nach wie vor werden Stämme einer Spezies zugeordnet, sobald eine indikative Verwandtschaft von mindestens 70 % bei einem maximalen Unterschied in der Schmelztemperatur von 5 % zwischen homo-logen und heterologen Hybridsträngen bei einer Durchführung unter Standardbedingungen vorliegt (Vandamme *et al.* 1996). Des Weiteren ermöglicht der Vergleich von Vollgenomsequenzen (in silico Hybridisierung) eine detaillierte Sicht auf die genetischen Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen (Nübel *et al.* 2017, unveröffentlicht).

1.2 Taxonomie der Ordnung Myxococcales

1.2.1 Spezies Definition

In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere Speziesdefinitionen publiziert, welche bis heute als gültig angesehen werden (Oren and Garrity 2014). Im Jahr 1970 schlug Colwell vor, dass eine Spezies eine Gruppe verwandter Organismen sei, welche sich von ähnlichen Gruppen durch eine signifikante Konstellation genotypischer, phänotypischer und ökologischer Charakteristiken unterscheide. Eine zeitgemäßere Definition verfassten Rosselló-Mora und Amann (2001), indem sie eine Spezies als monophyletisches und genetisch kohärentes Cluster aus individuellen Organismen beschreiben, das einen hohen Grad an Ähnlichkeit in vielen unabhängigen Charakteristiken teile und aufgrund einer eingrenzenden phänotypischen Besonderheit zu bestimmen sei. Diese Aussage konkretisierte ein Jahr später Erko Stackebrandt, indem er publiziert, eine Spezies sei „eine Kategorie, welche eine (bevorzugt) genomisch kohärente Gruppe von individuellen Stämmen umschreibe, die einen hohen Grad an Ähnlichkeit in (vielen) unabhängigen Eigenschaften ausweisen“. Zudem sollten diese Parameter verhältnismäßig unter hochstandardisierten Bedingungen bestimmt werden (Stackebrandt *et al.* 2002). Die genannten Definitionen lassen jedoch aufgrund der Auslegbarkeit der genannten Voraussetzungen zur Beschreibung einer neuen Art offen, welche Parameter für eine Neubeschreibung unabdingbar sind. Folglich ist nicht geklärt, inwiefern die Neubeschreibung von 600-700 Bakterienarten in den vergangenen Jahren gerechtfertigt waren (Oren and Garrity 2014) (s. Abb. 5).

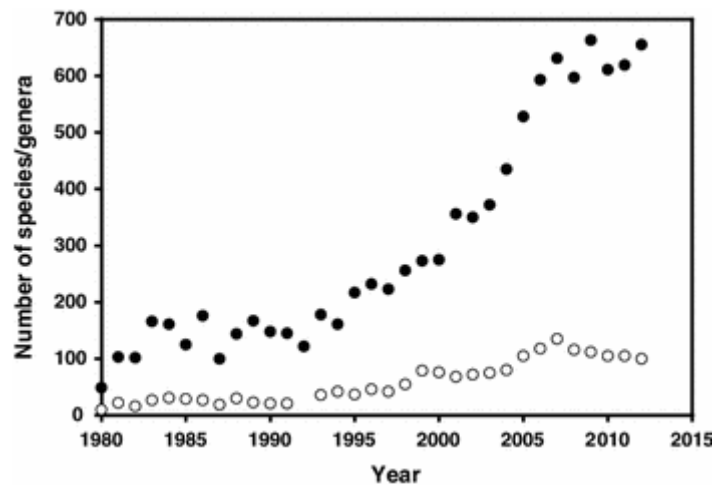


Abbildung 5 Anzahl der validierten, neuen Gattungen und Spezies zwischen den Jahren 1980 und 2013 (Oren und Garrity 2014).

Oren und Garrity postulierten im Jahr 2014 aufgrund dieser Vielzahl an Neubeschreibungen, dass wissenschaftliche Veröffentlichungen zur Beschreibung neuer Arten nach aktuellen Richtlinien verfasst werden sollten, die insbesondere die Neuartigkeit der Isolate sowie interessante Eigenschaften hervorheben. Um dies zu gewährleisten, müssten die Standardmethoden, die nach wie vor zur Artbeschreibung notwendig seien, um zusätzliche Methoden erweitert werden (Oren und Garrity 2014).

Im Optimalfall liegen mehrere Isolate vor, die, laut gängigen Methoden wie der DDH und der 16S rRNA-Gensequenzanalyse, zu ein und derselben Spezies gehören. Dies bietet die Möglichkeit, die Genome hinsichtlich der Kerngene, die das Taxon ausmachen, sowie der „*auxiliary genes*“, welche nicht in jedem Stamm der Spezies vorkommen und somit eine stammspezifische Charakteristik bilden, zu analysieren und untereinander zu vergleichen (Coenye 2005). Liegt nur ein Isolat vor, das laut Standardmethoden eine neue Spezies oder eine neue Gattung darstellt, ist dieser Vergleich folglich nicht möglich und stellt auch aktuell noch ein Problem in der heutigen Taxonomie dar. Des Weiteren stellt die Eigenschaft vieler Prokaryoten, homologe Rekombination durchzuführen, eine weitere Problematik in der Klassifikation vieler Bakterienarten dar (Papke *et al.* 2007).

1.3 Polyphasische Taxonomie

Seit den Anfängen der Mikrobiologie stellt die Beschreibung und Klassifizierung von Mikroorganismen eine große Problematik dar. So erfuhr die prokaryotische Taxonomie in den vergangenen 80 Jahren viele Veränderungen, welche nicht nur zu einer großen Zahl von entdeckten und beschriebenen neuen Gattungen, Spezies und Subspezies geführt haben, sondern auch Neuerungen in den grundlegenden Konzepten zur Nomenklatur und Klassifizierung von Bakterienarten mit sich brachten. So wurde die Taxonomie im Jahr 1980 mit angepassten Regeln für die Nomenklatur revolutioniert. Dies führte zu einer Zusammenlegung verschiedener Taxa und somit zu einer Dezimierung der Speziesanzahl. Basierte die erste phylogenetische Klassifizierung noch auf dem Grad der morphologischen Komplexität (Kluyver und van Niel 1936), so gilt bis heute die 1987 eingeführte Methode der 16S rRNA-Gensequenzanalyse als Grundlage zur Unterscheidung von Arten und Gattungen (Woese *et al.* 1987).

Um die derzeitigen Anforderungen der Beschreibung einer neuen Bakterienart zu erfüllen, ist eine phänotypische, genotypische sowie chemotaxonomische Datenerhebung und –auswertung unabdingbar. Dies wird unter der Begrifflichkeit „polyphasische Taxonomie“ zusammengefasst (Vandamme *et al.* 1996, Gillis *et al.* 2001, Moore *et al.* 2010, Oren und Garrity 2014) (s. Abb. 5). Die polyphasische Taxonomie steht im Gegensatz zu der Annahme, nur Stämme mit einer Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenz unter 97 % zu dem nächsten beschriebenen Typstamm würden eine neue Art repräsentieren. Viele Prokaryoten besitzen mehrere, teilweise sehr unterschiedliche, Kopien des 16S rRNA-Gens. Dies führt zu einer Entkräftung des Dogmas der 97 % Grenze. Um neue Arten zu beschreiben, ist es wichtig, den Wert der Homologie zwischen den 16S rRNA-Gensequenzen als Anhaltspunkt zu nehmen. Die putative neue Spezies muss jedoch durch phänotypische Methoden sowie DDH bestätigt werden (s. Abb. 6) (Rainey 2011).

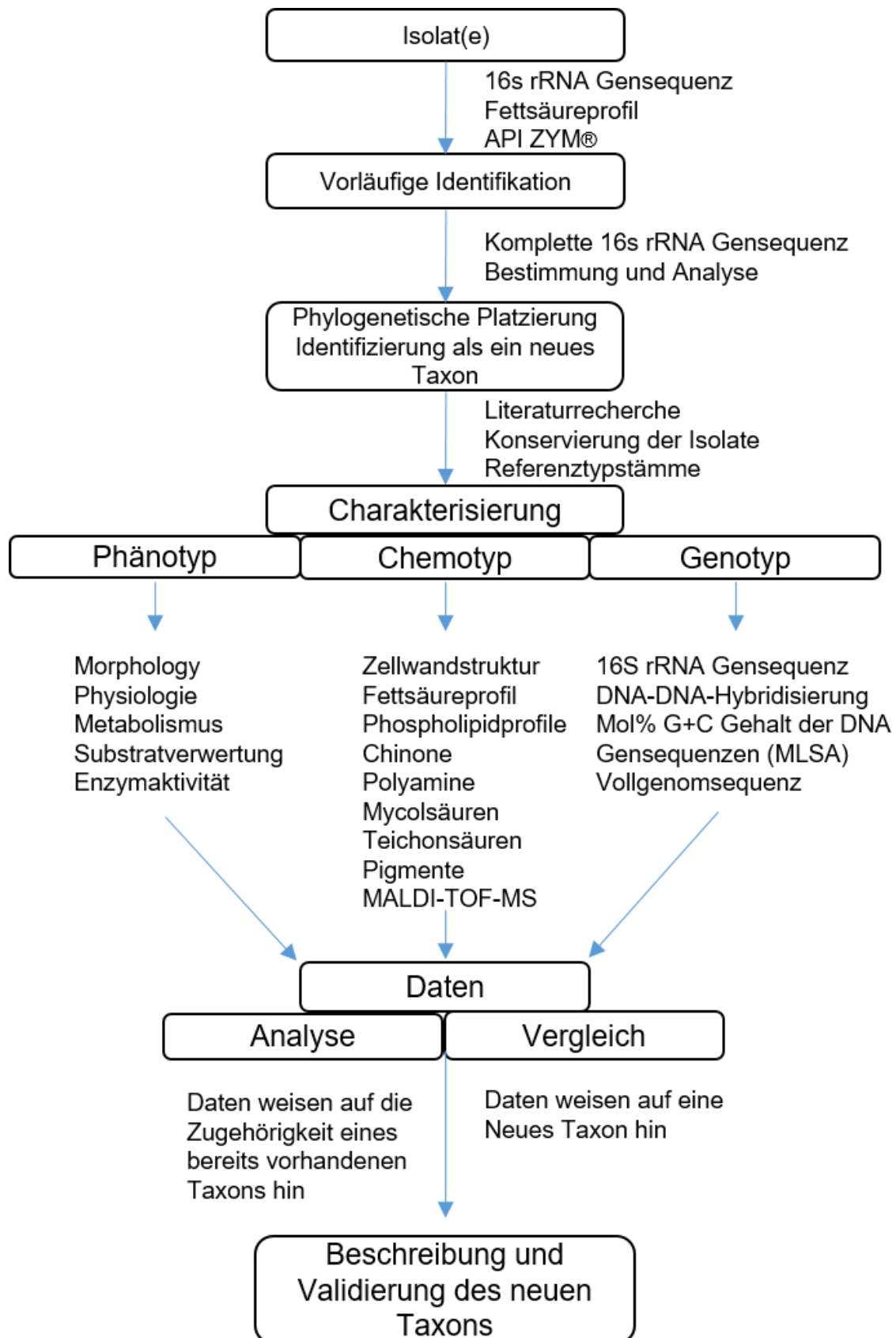


Abbildung 6 Ablauf der Charakterisierung und Beschreibung einer neuen, prokaryotischen Spezies (modifiziert nach Rainey 2011).

Die phänotypische Charakterisierung stellt nach wie vor, neben den chemotaxonomischen und genetischen Analysen, eine der Grundvoraussetzungen für die Beschreibung einer neuen Art dar (Oren und Garrity 2014). In dieser Arbeit wurde hierfür das Wachstum auf unterschiedlichen Medien und Energiequellen, das Schwarmverhalten der Myxobakterien, sowie die enzymatische Aktivität mittels APIZYM[®] untersucht. Ein wichtiger Bestandteil des chemotaxonomischen Teils der polyphasischen Taxonomie ist die MALDI-TOF/MS, die ebenfalls innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden Fettsäure- und Phospholipidprofile erstellt, um die untersuchten Stämme hinsichtlich ihres Stoffwechsels zu charakterisieren. Die Grundlage der genotypischen Analyse bildet die 16S rRNA-Gensequenzuntersuchung, die DDH sowie der Sequenzvergleich eines essentiellen und hoch konservierten Chaperon-Gens und eines, für Sorangien spezifischen, Zellulasegens. Hiermit können die Stämme zusätzlich eindeutig der Gattung *Sorangium* zugeordnet werden. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Nübel von der DSMZ werden die Vollsequenzen der untersuchten Stämme generiert, die die Voraussetzung für detailliertere, auf dem Genom basierende Untersuchungen bilden. Es können weitere Stammbäume für konstitutiv exprimierte, sogenannte „Haushaltsgene“ erstellt und miteinander verglichen werden. Dabei spielt es eine große Rolle, dass bei Myxobakterien im Laufe der Evolution kein, bzw. sehr wenig, horizontaler Gentransfer stattgefunden hat und die Verwandtschaftsverhältnisse der Stämme untereinander verlässlicher dargestellt werden können.

Die DDH ist nach wie vor der „Gold Standard“ zur Rechtfertigung einer neuen Spezies (Wayne *et al.* 1987). Allerdings wird sie allmählich von, auf der Vollsequenz basierenden, Analysemethoden wie ANI (*average nucleotide identity*, durchschnittliche Nukleotid-übereinstimmung) und CGI (*core gene identity*, Übereinstimmung der Kerngene), der Berechnung der MUM-Indizes (*maximal unique matches*, Übereinstimmende Teilabschnitte von zwei Genomen) und der prozentualen Bestimmung der konservierten DNA (pcDNA, *percentage of conserved DNA*) von eben dieser Position verdrängt (Richter und Rosello-Mora 2009, Vanleare *et al.* 2009, Deloger *et al.* 2009, Goris *et al.* 2007). Mit diesen Methoden können mit Hilfe der Vollsequenz die DDH Experimente *in silico* imitiert werden. Bei einem DDH Experiment wird der Grad der Reassoziations der genomischen DNA des zu untersuchenden Stammes an die DNA des nächsten Verwandten bestimmt und in einem prozentualen Wert ausgedrückt. Liegt dieser Wert unter 70 %, kann man, durch zusätzliche Untermauerung mit Daten aus chemotaxonomischen und phänotypischen Analysemethoden, von einer neuen Spezies ausgehen. Die DDH bietet sich insbesondere für den Fall an, wenn eine Homologie des 16S rRNA-Gens über 98,2 % vorliegt, aufgrund von anderen Parametern jedoch der Verdacht

auf die Zugehörigkeit zu einer neuen Art besteht (Stackebrandt *et al.* 2002, Stackebrandt und Ebers 2006, Meier-Kolthoff *et al.* 2013).

Die 16S rRNA-Gensequenzanalyse oder die DDH reichen jedoch nicht als alleinstehende Methoden für eine taxonomische Definition einer neuen Art aus. Eine Einbeziehung der metabolischen und chemotaxonomischen Eigenschaften in die Charakterisierung ist notwendig. Derzeit ist es noch nicht gelungen, von den genetischen Daten verlässliche Rückschlüsse auf den kompletten Metabolismus von Prokaryoten zu ziehen. Diese „*in silico* Chemotaxonomie“ hat jedoch Potenzial, in der Zukunft Aussagen über bestimmte Parameter tätigen zu können (Sutcliffe *et al.* 2012).

Vandamme und Peeters (2014) prognostizieren, dass die Zukunft in der Beschreibung und Benennung neuer Arten hauptsächlich auf der Vollgenomsequenz basiert und die phänotypischen Eigenschaften auf eine minimierte, verlässliche Basis reduziert werden wird.

1.3.1 Polyphasischer Ansatz zur Aufklärung der Phylogenie der Gattung *Sorangium*

Die Gattung *Sorangium* ist der Unterordnung der Sorangiineae, Ordnung Myxococcales, untergeordnet. Die einzige bisher beschriebene und validierte Spezies dieser Gattung trägt den Namen *cellulosum* und besitzt die Eigenschaft, Zellulose als Energiequelle nutzen zu können. Das wissenschaftliche Interesse an *S. cellulosum* beruht auf der Tatsache, dass diese Mikroorganismen eine hohe Kapazität für die Produktion von biologisch aktiven und somit pharmazeutisch interessanten Wirkstoffen haben (Gerth *et al.* 2003). In den vergangenen Jahrzehnten wurden trotz einer 16S rRNA-Gensequenzhomologie von mehr als 97 % bereits unterschiedliche Vorschläge für eine Unterteilung der Spezies *S. cellulosum* in weitere Spezies oder Unterklassen, in der Literatur publiziert (Jiang *et al.* 2008). So postulierten Shimkets *et al.* (2006), dass sich die Spezies aufgrund der Farbe der Fruchtkörper in drei putative Spezies aufteilen ließe. Stämme mit orangefarbenen Fruchtkörpern wurden der Gattung „*Sorangium compositum*“ zugeordnet, wohingegen die Stämme mit braunen bzw. schwarzen Fruchtkörpern in die Arten „*Sorangium cellulosum*“ und „*Sorangium nigrum*“ eingeordnet wurden. Die Autoren merkten jedoch an, dass eine derartige Unterteilung, die lediglich auf einem morphologischen Merkmal basiert, keine verlässliche Basis für die Validierung neuer Arten bilde. Aufgrund der großen morphologischen, genetischen und chemotaxonomischen

Unterschiede zwischen den *Sorangium* Isolaten müssten weitere Untersuchungen diese Hypothese untermauern (Shimkets *et al.* 2006). Jiang *et al.* untersuchten im Jahr 2008 insgesamt 22 *Sorangium* Stämme hinsichtlich der Homologie der 16S rRNA Sequenz sowie anhand der Sequenz von zwei Varianten des hochkonservierten, ubiquitären Gens für das Hitzeschockprotein HSP60 (*groEL1* und *groEL2*). Die daraus resultierenden phylogenetischen Bäume, verglichen mit der Form der Sporangien, indizierten die Existenz zweier Spezies innerhalb der Gattung. Eine Untergruppierung der Spezies aufgrund der Fruchtkörperfärbung wird somit als unwahrscheinlich angesehen. Das für Sorangien spezifische Zellulasegen *xynB1* bietet neben *groEL1* ebenfalls die Möglichkeit, die Verwandtschaftsverhältnisse der Stämme detaillierter darzustellen. Der Sequenzvergleich zeigte eine Unterteilung der Spezies in fünf definierte Untergruppen (Lee *et al.* 2010, Lee *et al.* 2012). Sowohl die Analyse mittels HPLC der Kulturextrakte der fünf Gruppen, als auch die Amplifizierung unterschiedlicher Biosynthesegene zeigten charakteristische Muster für jede der Untergruppen (Lee *et al.* 2012). In einer Studie über epothilonproduzierende *S. cellulosum* Stämme aus 14 unterschiedlichen Bodenproben wurden die Isolate aufgrund ihrer 16S sRNA-Gensequenzunterschiede in sieben Untergruppen unterteilt. Dieses Ergebnis wurde jedoch nicht durch weiterführende Untersuchungen gestützt (Li *et al.* 2013).

1.4 Zielsetzung

Aufgrund von zahlreichen morphologischen und biochemischen Unterschieden gibt es viele Hypothesen über eine Aufgliederung der Spezies *S. cellulorum* in mehrere unterschiedliche Arten. Ziel dieser Arbeit war es, diese Hypothesen aufzunehmen und einen polyphasischen Ansatz zur Phylogenie der Gattung *Sorangium* zu etablieren. Um eine möglichst verlässliche Klassifizierung zu gewährleisten, wurden mehrere Methoden zur phänotypischen, genotypischen und chemotypischen Analyse der Stämme angewendet (s. Abb. 7). Der 16S rRNA-Gensequenzvergleich, sowie die Sequenzanalysen des Zellulasegens *xynB1* und des Hitzeschockproteingens *groEL1* dienten als Basis zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums, der mit Hilfe von enzymatischen Untersuchungen und MALDI-TOF/MS in verschiedene, definierte Kladen unterteilt wurde. Es folgte eine Auswahl von repräsentativen Typstämmen von insgesamt 15 entstandenen Kladen, die jeweils möglichst viele Merkmale der Mitglieder einer monophyletischen Gruppe widerspiegeln. Die ausgewählten Typstämmen wurden mittels DNA-DNA-Hybridisierung mit dem validierten Typstamm Soce 1871 verglichen, um eine Abgrenzung in unterschiedliche Spezies zu belegen. Es wurden zusätzlich die Fettsäurezusammensetzungen sowie die Phospholipidmuster der Typstämmen bestimmt.

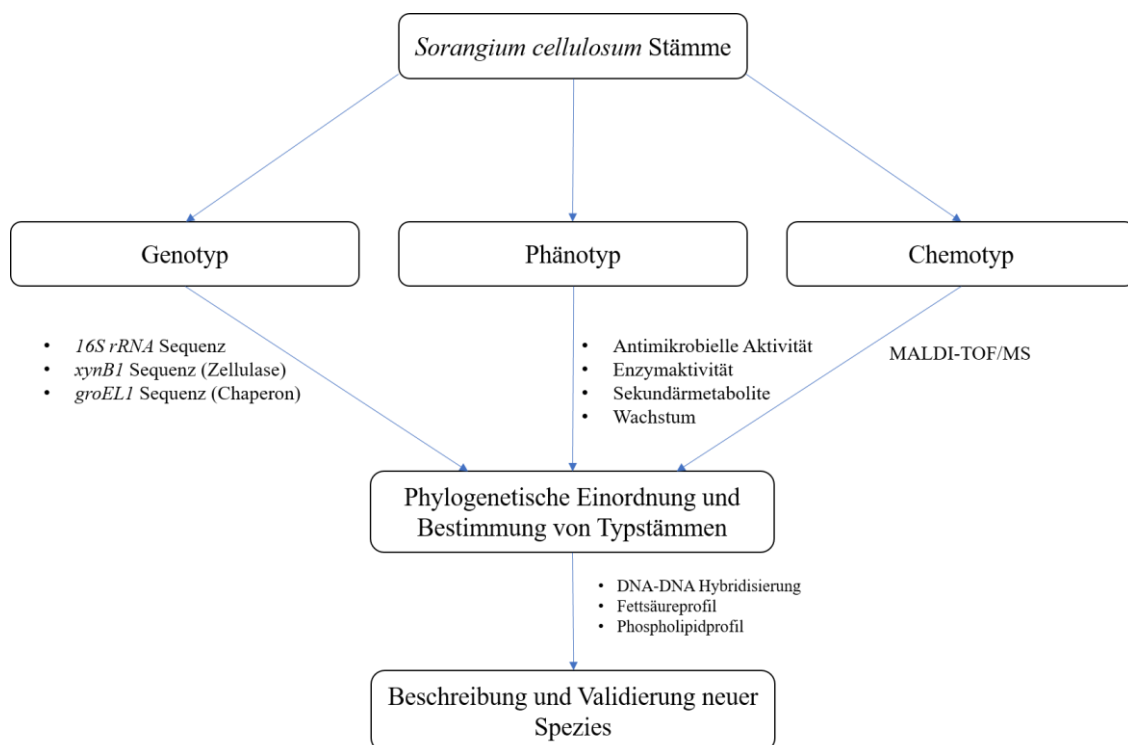


Abbildung 7 Ablauf der Analyse zur Taxonomie von *Sorangium*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Nährmedien und Lösungen

Alle Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1 L Medium/ Lösung. Die Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und der pH-Wert mit 1 N NaOH bzw. HCl eingestellt. Die Medien wurden bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung von festem Nährmedium wurden pro L 15 g Bacto® Agar hinzugefügt.

VY/2 Medium (pH 7,5)

5 g	Bäckerhefe
1 g	CaCl ₂ ·H ₂ O
0,5 g	Cyanocobalamin

P-Medium (pH 7,5)

2 g	Pepton
8 g	Stärke
4 g	Propion
2 g	Hefeextrakt
1 g	CaCl ₂
1 g	MgSO ₄
100 mM	HEPES
8 mg	Fe/EDTA

Stan-21 Medium (pH 7,2)

1 g	K ₂ HPO ₄
2 ml	Hefextraktlösung (1 %)
1 g	KNO ₃
1 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O

0,1 g	MnSO ₄
0,33 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O
1 ml	Spurenelementlösung (Drews 1974)
1 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O

Vitaminlösung nach Schlegel (1992)

2 mg	Biotin
20 mg	Niacin
10 mg	Thiamin
10 mg	4-Aminobenzoessäure
5 mg	Panthothenat
50 mg	Pyridoxamin
20 mg	Cyanocobalamin

CY/H Medium (pH 7,3)

1 g	Entfettetes Sojamehl
1 g	Glukose
4 g	Stärke
1,5 g	Hefeextrakt
1,5 g	Bacto Casiton [®]
1,0 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O
0,5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
8 mg	Fe/EDTA
11,8 g	HEPES
1 ml (Hinzufügen nach der Sterilisierung, für festes Medium)	Vitaminlösung (Schlegel 1992)

H Medium

0,2 g	Entfettetes Sojamehl
0,8 g	Stärke
0,1 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O
0,1 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,2 g	Hefeextrakt
50 mM	HEPES

8 mg	Fe/EDTA
------	---------

S Medium (pH 7,4)

0,2 g	Entfettetes Sojamehl
0,8 g	Stärke
0,1 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O
0,1 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
50 mM	Hepes
8 mg	Fe/EDTA

M Medium (pH 7,2)

10 g	Sojapepton
10 g	Maltose
1 g	CaCl ₂
1 g	MgSO ₄
11,9 g	HEPES
80 mg	Fe/EDTA

Wassermedium (pH 7,2)

18 g	Agar
1,5 g	CaCl ₂
1,5 g	MgSO ₄
11,8 g	HEPES
1 ml (Hinzufügen nach der Sterilisierung)	Vitaminlösung (Schlegel 1992)

MYC Medium (pH 7,0)

10 g	Phyton Pepton
10 g	Glukose
11,9 g	HEPES
18 g	Agar

Middlebrook 7H9 Broth Base (Fluka)

0,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
2,5 g	Na ₂ HPO ₄
1,0 g	KH ₂ PO ₄
0,1 g	NaCl
50 mg	MgSO ₄
0,5 mg	CaCl ₂
1 mg	ZnSO ₄
1 mg	CuSO ₄
40 mg	Ammonium Eisen(III)-citrat (C ₆ H _{5+4y} Fe _x N _y O ₇)
0,5 g	Glutaminsäure
1 mg	Pyridoxin
0,5 mg	Biotin

Müller-Hinton Broth (pH 7,4)

2,0 g	Rinder Infusion
1,5 g	Maisstärke
17,5 g	Pepton aus Casein

TAE-Puffer (fünfzigfach konzentriert, pH 8,5)

18,61 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
57,1 ml	Eisessig
242 g	TRIS Base

2.1.2 Chemikalien

Name	Hersteller
1 kb Marker N3232	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Aceton	
Acetonitril	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Gibco [®] , Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA
4-Aminobenzoessäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bacto Agar [®]	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Bacto Casiton [®]	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Biotin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Cyanocobalamin	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Dittmer-Lester-Reagenz	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
DNA Marker (100 bp)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
DMSO	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Riedel de-Haen AG, Seelze, Deutschland
Eisen(II)-Chlorid (FeCl ₂ ·6H ₂ O)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ethanol	Mallinckrodt Baker B.V, Holland
Gelstar [™]	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Glukose	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Ohly GmbH, Hamburg, Deutschland

HEPES	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Kaliumnitrat (KNO ₃)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Kalziumchlorid (CaCl ₂ ·H ₂ O)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Maltose	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mangansulfat (MnSO ₄)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MSTFA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Methanol	J.T. Baker, Darmstadt, Deutschland
Methansäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Middlebrook 7H9 Broth Base	Bekton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Molybdänblau	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Molybdätophosphorsäure	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Müller-Hinton Broth	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	Riedel de-Haen AG, Seelze, Deutschland
Niacin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ninhydrin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Panthothensäure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phyton Pepton	Marcor, Carlstadt, USA
Propionsäure	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Pyridoxamin	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	J.T. Baker, Darmstadt, Deutschland
Sojamehl, entfettet	Cargill GmbH, Salzgitter, Deutschland
Sojapepton	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Stärke	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thiamin	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Toluen	J.T. Baker, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
TRIS Base	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
XAD® Amerlight 16N Absorberharz	Rohm and Haas, Philadelphia, USA

2.1.3 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit untersuchten 73 Stämme wurden randomisiert aus der Stammsammlung des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig entnommen (s. Tab. 2).

Die pathogenen Teststämme für den Serienverdünnungstest (Bioaktivitätstest) sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2 In dieser Arbeit untersuchte Isolate von *S. cellulorum*

Nr.	Stammbezeichnung	DSM-Nr.	Isoliert von (Person)	Isolation	Herkunft	Details zu Probenort	Probenmaterial
1	GT47	o. A.	Gerth	Mrz 04	Ägypten	o. A.	o. A.
2	Soce 26	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.
4	Soce 62	o. A.	Reichenbach	Okt 85	Indonesien	nahe Bromo	o. A.
3	Soce54	o. A.	Reichenbach	Sep 85	Australien	nahe Bairnsdale, Victoria	Erde mit Pflanzenresten und Dung
5	Soce 105	53212	Reichenbach	Dez 85	Spanien	Nähe Cancarix, Albacete	Gartenerde
6	Soce 117	53218	Vockerodt	Jan 86	Frankreich	Zw. Neufchateau und Vittel	Erde unter Zirbelkiefer
7	Soce 118	53219	Vockerodt	Jan 86	Frankreich	Nahe Grand	Erde mit Pflanzenresten
8	Soce 119	53220	Reichenbach	Feb 86	China	Kunming	Erde
9	Soce 124	53224	Reichenbach	Feb 86	Südafrika	o. A.	Erde
10	Soce128	o. A.	Reichenbach	Mrz 87	Türkei	o. A.	Sand
11	Soce 134	53229	Reichenbach	Apr 86	Südafrika	Nahe South Luangwa	Erde
12	Soce 145	53236	Reichenbach	Jul 86	Österreich	nahe Eisenkappel	Erde
13	Soce 176	53252	Reichenbach	Jun 87	Ungarn	o. A.	Erde mit Pflanzenresten
14	Soce 136	53231	Reichenbach	Apr 86	Marokko	o. A.	Erde mit Pflanzenresten
15	Soce 185	o. A.	Vockerodt	Jul 87	Nigeria	Lantar, nahe Abeokuta	Erde mit Pflanzenresten
16	Soce 204	o. A.	Reichenbach	Nov 87	Tunesien	Hammamet	Erde mit Pflanzenresten unter Palme

17	Soce 216	53276	Vockerodt	Feb 88	Österreich	Günzburg, Donauried	Sandige Erde mit Pflanzenresten
18	Soce 233	53286	Reichenbach	Mrz 88	Ägypten	nahe Ismaeliya	Erde mit Pflanzenresten
19	Soce 260	o. A.	Reichenbach	Nov 88	Bulgarien	NaheVarna-Goldstrand	Erde mit Pflanzenresten
20	Soce 269	53304	Reichenbach	Jan 89	Schweden	o. A.	Erde mit Pflanzenresten
21	Soce 281	o. A.	Reichenbach	Feb 89	Ungarn	nahe Varna-Goldstrand	Sanfige Erde mit Pflanzenresten/ Wald
22	Soce 291	53319	Reichenbach	Mai 89	Italien	Herculaneum/ Ercolano	Gartenerde mit Pflanzenresten
23	Soce 295	o. A.	Reichenbach	Jun 89	USA	Miccosukee, Florida	Sandige Erde mit Pflanzenresten
24	Soce 296	o. A.	Reichenbach	Jun 89	Südafrika	nahe Umzinto	Erde mit Pflanzenresten
25	Soce 302	o. A.	Vockerodt	Jul 89	Griechenland	Peleponnes	Rinde eines Olivenbaums
26	Soce 307	o. A.	Reichenbach	Sep 89	Israel	Jerusalem	Erde mit Pflanzenresten
27	Soce 321	53339	Reichenbach	Sep 89	Bulgarien	o. A.	Erde mit Pflanzenresten
28	Soce 326	53344	Reichenbach	Sep 89	Marokko	Zw. Marakesh und Agadir	Erde mit Pflanzenresten
29	Soce 327	53345	Reichenbach	Sep 89	Italien	Pompeji	Erde mit Pflanzenresten
30	Soce 341	o. A.	Kleeberg	Sep 89	Syrien	Palmyra	Erde mit Pflanzenresten aus Palmengarten
31	Soce 350	53361	Harder	Okt 89	Syrien	Damaskus	Erde mit Pflanzenresten
32	Soce 362	o. A.	Nalaskowski	Nov 89	Schweiz	nahe Salouf, 1300 m Höhe	Erde mit Pflanzenresten
33	Soce 363	53370	Harder	Nov 89	Syrien	Nahe Lattakia	Erde mit Pflanzenresten
34	Soce 367	o. A.	Harder	Nov 89	Kenia	Mount Kilimanjaro	Erde mit Pflanzenresten
35	Soce 375	o. A.	Harder	Nov 89	Kenia	Nairobi	Erde mit Pflanzenresten
36	Soce 381	53379	Kleeberg	Nov 89	Japan	nahe Santo	Schlamm von Reisplantage
37	Soce 385	53382	Kleeberg	Nov 89	Sri Lanka	Wilpattu Nationalpark	Erde mit Pflanzenresten
38	Soce 388	53384	Kleeberg	Dez 89	Japan	nahe Wadayama	Erde mit Pflanzeesten
39	Soce 394	53390	Reichenbach	Dez 89	Guatemala	nahe Santiago Atitlan	Erde mit Pflanzenresten
40	Soce 406	53400	Reichenbach	Dez 89	Guatemala	nahe Los Amates	Erde mit Pflanzenresten
41	Soce 429	o. A.	Vockerodt	Jan 90	Schweden	o. A.	Erde mit Pflanzenresten
42	Soce 448	53431	Kleeberg	Feb 90	Japan	Nahe Wadayama	Erde mit Pflanzenresten
43	Soce 542	53484	Dockhorn	Aug 90	Indien	Delhi	Schlamm von Reisplantage
44	Soce 590	o. A.	Scheddin	Nov 90	Niederlande	nahe Slagelse/ Stillinge	Fäkalien von Pflanzenfresser
45	Soce 693	o. A.	Dockhorn	Jul 91	Neuseeland	Strand	Sandige Erde mit Pflanzenresten
46	Soce 726	o. A.	Dockhorn	Sep 91	Malaysia	nahe Pulau Tioman	Sandige Erde mit Pflanzenresten
47	Soce 764	o. A.	Reichenbach	Nov 91	Norwegen	Oslo	Erde mit Pflanzenresten
48	Soce 834	o. A.	Reichenbach	Jul 92	USA	North Carolina	Erde mit Pflanzenresten
49	Soce 836	o. A.	Reichenbach	Jul 92	USA	North Carolina	Erde mit Pflanzenresten u. Kieselsteinen
50	Soce 854	o. A.	Reichenbach	Okt 92	Indonesien	nahe Wlingi	Erde mit Pflanzenresten
51	Soce 861	o. A.	Reichenbach	Dez 92	Indonesien	Tambak	Erde
52	Soce 887	o. A.	Reichenbach	Jul 93	Schweiz	Hengersberg	Erde mit Pflanzenresten und Kieselsteinen

53	Soce 1000	o. A.	Oumard	Mai 94	Südafrika	1900 m Höhe	Erde
54	Soce 1008	o. A.	Reichenbach	Jun 94	Malaysia	Penang Island	Erde mit Pflanzenresten
55	Soce 1014	o. A.	Reichenbach	Jul	Deutschland	Nahe Wolfenbüttel	Sand mit Pflanzenresten
56	Soce 1024	o. A.	Reichenbach	Jul 94	Thailand	Bangkok	Erde mit Pflanzenresten/ Gerstenfeld
57	Soce 1036	o. A.	Reichenbach	Sep 94	Ägypten	nahe Edfu	Erde mit Pflanzenresten
58	Soce 1078	o. A.	Reichenbach	Nov 94	Namibia	nahe Neispi	Erde mit Pflanzenresten
59	Soce 1097	o. A.	Reichenbach	Jan 95	Taiwan	nahe Tainan	Sand
60	Soce 1099	o. A.	Reichenbach	Jan 95	Namibia	nahe Augrabis Falls	Sandige Erde mit Pflanzenresten
61	Soce 1128	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.
62	Soce 1151	o. A.	Reichenbach	Aug 95	Niederlande	Küste am Atlantik	Sand
63	Soce 1153	o. A.	Reichenbach	Aug 95	Taiwan	Taipeh	Sand mit Pflanzenresten/ Düne
64	Soce 1335	o. A.	Heinze	Aug 96	Indien	Lucknow, Uttar Pradesh	Erde mit Pflanzenresten
65	Soce 1389	o. A.	Heinze	Dez 96	USA	nahe Bisbee, Arizona	Erde mit Pflanzenresten
66	Soce 1504	o. A.	Heinze	Okt 97	Malta	La Valetta	Erde mit Pflanzenresten
67	Soce 1564	o. A.	Heinze	Jul 98	Polen	nahe Krutyn	Erde mit kleinen Pflanzenresten
68	Soce 1654	14731	Reichenbach	Okt 99	Indonesien	nahe Ubud, Bali	Erde mit Pflanzenresten
69	Soce 1667	53553	Reichenbach	Nov 99	Deutschland	Hannberg	Erde mit Pflanzenresten
70	Soce 1826	o. A.	Reichenbach	Dez 00	Ägypten	Qlien, Qafar-el-Schkh	Erde mit Pflanzenresten
71	Soce 1828	o. A.	Reichenbach	Dez 00	Ägypten	nahe Sanors/ El-Fayom	Erde mit Pflanzenresten
72	Soce 1866	53595	Reichenbach	Mrz 01	USA	San Diego, Kalifornien	Erde mit kleinen Pflanzenresten
73	Soce 1871	14627	Reichenbach	Jan 01	Griechenland	Rhodos, nahe Kattavia	Erde mit Pflanzenresten

Tabelle 3 Pathogene Teststämme für den Bioaktivitätstest Test

Bezeichnung	Stammdefinition/ Hinterlegungsnummer
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA14 (DSM 19882)
<i>Escherichia coli</i>	DSM-1116 (ATCC9637)
<i>Escherichia coli TolC</i>	Ciba-Geigy AG
<i>Staphylococcus aureus</i>	Newman
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 1790
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10 (ATCC6051)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC700084
<i>Chromobacterium violaceum</i>	DSM 30191 (ATCC12472)
<i>Candida albicans</i>	DSM 1665
<i>Pichia anomala</i>	DSM 6766
<i>Mucor hiemalis</i>	DSM 2656

2.1.4 Kits

QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)

Invisorb Spin Plant Mini Kit (Stratec Molecular)

NucleoSpin® DNA and RNA Clean Up Kit (Macherey-Nagel)

2.1.5 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Tischautoklav 3150 EL Varioklav Dampfsterilisator 25T	Systec GmbH, Wetztenberg Biomedis, Giessen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Dokumentationsstation	Herolab UV-Transilluminator und Kamera	Herolab Laborgeräte GmbH, Heidelberg, Deutschland
HPLC-System	Agilent 1260	Agilent, Santa Clara, USA
Lyophilisator	ALPHA 1-2 LDPlus	Martin Christ, Osterode, Deutschland
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph Instrument, Schwabach, Deutschland
Massenspektrometer	MaXis II	Bruker, Billerica, USA
Mikroskop	Zeiss Mikroskop AXIO-SCOPE	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Netzgerät	Power Pac 300	Bio-Rad, Kalifornien, USA
pH Messgerät	765 Labor Ph-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, Deutschland Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research 0,5-10 µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000 µl, 500-5000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stereomikroskop	Olympus ZSX12	Olympus, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank	HeraSafe HS12 Plus HeraSafe ksp12	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

	Lamin Air Heraeus HLB 2472	Thermo Scientific, Langensebold, Deutschland
	Thermo Scientific Type MS 2020 1.2	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwalbach, Deutschland
UV Detektor	Herolab RH-5.1 + B-1393- 3K7N Kamera	Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland
Vortexer	RCT basic	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Waagen	MasterPro LA 620P LC1200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Zentrifuge 5414R mit Rotor	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Zentrifuge 5424R mit Rotor	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Rotilabo-Zentrifuge mit Butterfly-Rotor	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5414	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Myxobakterien

Für die Reaktivierung der kryokonservierten Stämme wurde aufgetaute Zellmasse auf VY/2, P, Stan21 + Filterpapier sowie auf Wasser Agarplatten ausgestrichen und bei 30 °C für fünf Wochen inkubiert.

Für die Anzucht in Flüssigmedium wurde die Zellmasse in 10 ml CY/H Medium + 10 µl Vitaminlösung in einen 100 ml Erlenmeyerkolben transferiert und für 3-5 Tage bei 30 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert, bis ein Wachstum der Kultur eintrat. Um die Vitalität und die Reinheit der Bakterien zu überprüfen, wurde ein Tropfen der Kultur mittels Lichtmikroskop untersucht. Anschließend wurde das Volumen der Kultur in einem 250 ml Erlenmeyerkolben auf 100 ml erhöht und weitere 7 Tage bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Für ein verbessertes Wachstum wurde 1 % Glukoselösung zugegeben. Nach der Inkubationsperiode wurde die Zellmasse für die DNA Extraktion sowie den Enzymaktivitätstest mittels APIZYM® verwendet. Jeweils 10 ml der Zellsuspension wurden in 100 ml M Medium gegeben, um hefefreie Zellkulturen für weitere Analysemethoden zu erhalten. Die Kulturen wurden ebenfalls 7 Tage bei 30 °C schüttelnd inkubiert.

Für die Herstellung von Kulturextrakten wurden jeweils 100 ml H Medium bzw. S Medium mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und XAD® Adsorber Harz zugegeben. Die Kulturen wurden 13-14 Tage inkubiert, um die Produktion von Sekundärmetaboliten zu gewährleisten.

2.2.1.1 Lyophilisation der Zellmasse aus Flüssigkultur

Für die Gefriertrocknung wurde pro Stamm eine 100 ml Kultur in M Medium verwendet. Zunächst wurden je zwei Mal 50 ml Zellsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und nacheinander für 5 min bei 14000 rpm um 10 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde die Suspension zwei Mal mit je 25 ml 0,01 m PBS-Lösung gewaschen. Bei diesen Schritten wurde die Suspension jeweils 20 min bei 14000 rpm bei 10 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das feuchte Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Lyophilisator über Nacht gefriergetrocknet.

2.2.2 Untersuchung der Rohextrakte auf antimikrobielle Aktivität

Um die biologisch aktiven Sekundärmetaboliten der *S. cellulorum* Stämme zu bestimmen und zu quantifizieren, wurde ein Dereplikationssystem verwendet. Hierbei handelt es sich um die Verbindung eines Bioaktivitätstests mit anschließender Analyse mittels hochauflösender Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (HRESIMS). Die Substanzen in den Extrakten wurden hinsichtlich ihrer molekularen Massen und Molekularformeln mittels MaXis Elektrospray-Ionisation Flugzeitmassenspektrometer (*electrospray ionisation time of flight mass spectrometry*, ESI-TOF-MS) mit einem Agilent 1260 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographiesystem (*reversed phased high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) untersucht.

2.2.2.1 Ernte des Amberlite® XAD®-16N Adsorber Harzes

Das Amberlite® XAD®-16N Harz aus 100 ml Produktionskulturen (S bzw. H Medium) der Typstämme wurde geerntet, um anschließend die daran gebundenen Sekundärmetaboliten der Myxobakterien zu extrahieren und analysieren. Hierzu wurde die Kultur über ein Sieb mit einer Porengröße von 200 µm abgegossen, um die darin enthaltenen Amberlite® XAD®-16N Partikel aufzufangen. Das Amberlite® XAD®-16N wurde mit dH₂O gespült und mit einem Spatel in einen 250 ml Erlenmeyerkolben transferiert. Nach der Zugabe von 70 ml Aceton wurde die Suspension für 1 h unter dem Abzug bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung über einen Filter in einen 100 ml Rundkolben gegeben. Mittels Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel entfernt. Der Rohextrakt im Rundkolben wurde in 1 ml Methanol gelöst.

2.2.2.2 Verdünnungsreihe des Extraktes zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

Um die biologische Aktivität eines Rohextraktes zu bestimmen, wurden 96-Lochplatten im Mikrotitermaßstab mit 11 klinisch relevanten, pathogenen Bakterien- und Pilzarten beimpft. Im Falle einer Reinsubstanz bekannter Konzentration kann man die minimale Hemmkonzentration (MIC) bestimmen. Die MIC bezeichnet die geringste Konzentration, bei der ein Wirkstoff antimikrobielle Wirkung zeigt. Da in diesem Fall Rohextrakte mit Gemischen unbekannter Sekundärstoffe in unterschiedlicher Konzentration vorliegen, kann mit Hilfe des Serienverdünnungstests lediglich die biologische Aktivität der Extrakte bestimmt werden. Bei den Testorganismen handelte es sich um die Gram-positiven Bakterien *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Mycobacterium smegmatis*, sowie die Gram-negativen Erreger *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* sowie die Pilze *Candida albicans*, *Pichia anomala* und *Mucor hiemalis*.

Pro getestetem Erreger wurde jeweils eine 96-Well-Mikrotestplatte mit, für den Erreger spezifischem, Medium vorbereitet. Hierzu wurden je 20 ml Müller-Hinton Medium für die meisten Bakterien, Middlebrook Medium für *M. smegmatis* und MYC Medium für die Pilze in je 50 ml Reaktionsgefäße gegeben. Anschließend wurden jeweils 300 µl des kryokonservierten Testkeims hinzugegeben (OD₆₀₀ 0,01; bei Hefen und Pilzen OD₆₀₀ 0,05) und mittels Vortexer homogenisiert. *P. aeruginosa* wurde zuvor für 1 h bei 37 °C prä-inkubiert. In die Vertiefungen der 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden anschließend an den Positionen A1-A11 je 20 µl von den zu testenden Rohextrakten vorgelegt (s. Abb. 8).

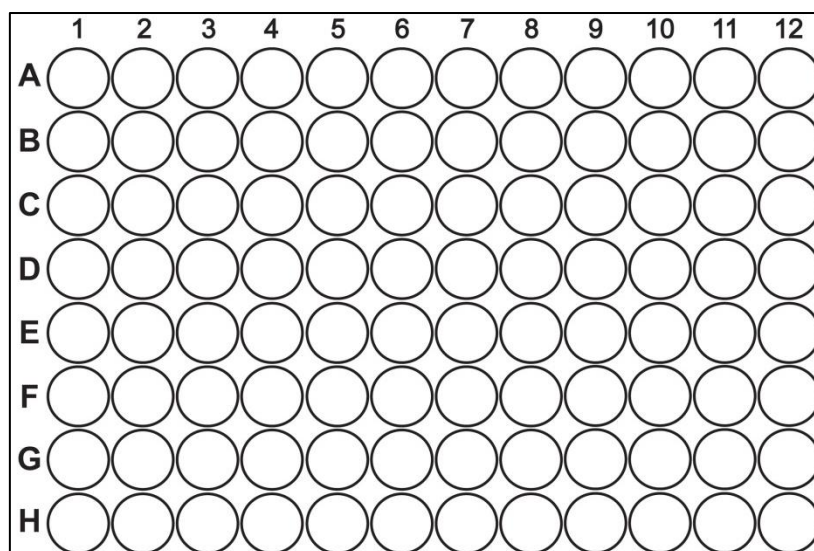


Abbildung 8 Schematische Darstellung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte.

In Position A12 wurde zur Kontrolle 20 µl Methanol gegeben, um sicherzustellen, dass das in den Rohextrakten enthaltene Methanol das Wachstum der zu testenden Organismen nicht hemmt. Anschließend wurden pro Mikrotestplatte in Reihe A jeweils 280 µl des jeweiligen Testorganismus hinzupipettiert. In die übrigen Vertiefungen der Platte wurden je 150 µl des Testorganismus gegeben. Es wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend in den Vertiefungen A-H hergestellt, indem in Reihe A die Rohextrakte mit den Testorganismen mit Hilfe einer Mehrkanalpipette gemischt wurden. Anschließend wurden aus den Vertiefungen der Reihe A 150 µl entnommen und mit denen der Reihe B vermischt. Dies wurde bis zu Reihe H wiederholt. Nach der letzten Verdünnung wurden die überschüssigen 150 µl Medium verworfen. Die Platten wurden danach auf einem Schüttler bei 160 rpm bei 30 °C bzw. 37 °C über Nacht inkubiert (s. Tab. 4).

Tabelle 4 Auflistung der Medien und Inkubationstemperaturen für die Teststämme des Bioaktivitätstests

Teststamm	Medium	Inkubationstemperatur
<i>S. aureus Newman</i>	MHB	30 °C
<i>B. subtilis</i>	MHB	30 °C
<i>M. luteus</i>	MHB	30 °C
<i>M. smegmatis</i>	Middlebrock	37°C
<i>E. coli</i>	MHB	37°C
<i>E. coli TolC</i>	MHB	37°C
<i>P. aeruginosa</i>	MHB	37°C
<i>Ch. violaceum</i>	MHB	30 °C
<i>C. albicans</i>	MYC	30 °C
<i>M. hiemalis</i>	MYC	30 °C
<i>P. anomala</i>	MYC	30 °C

Die Platten wurden visuell ausgewertet, sofern ein Wachstum in der jeweiligen Methanol-Kontrolle stattgefunden hat. Für *C. violaceum* und *P. aeruginosa* wurde zusätzlich eine mögliche Farbstoffhemmung vermerkt. Dafür wurde die Mikrotiterplatte, die den Testorganismus *C. violaceum* enthielt, nach der Bestimmung der Hemmintensität im Trockenschrank bei 42 °C über Nacht getrocknet. Anschließend wurden 150 µl DMSO in jede Vertiefung gegeben und die Platte leicht geschüttelt. Das Wachstum korreliert mit der Intensität der violetten Farbe in den einzelnen Vertiefungen.

P. aeruginosa verfärbte sich durch die Zugabe von 50 µl Chloroform grünlich. Die Hemmung wurde anschließend visuell ausgewertet.

2.2.2.3 Analyse der Rohextrakte mittels HRESIMS

Da nach dem Serienverdünnungstest zwar eine Aussage über die Aktivität, nicht jedoch über die für die Aktivitäten verantwortlichen Substanzen getroffen werden konnte, wurden die Rohextrakte nach den Hemmtests mittels HPLC analysiert und die aktiven Substanzen zusätzlich fraktioniert. Somit konnte eine Peak-Aktivitätskorrelation hergestellt werden. Um die unterschiedlichen Komponenten innerhalb des Extraktes zu detektieren, wird die sogenannte Retentionszeit und das UV-Spektrum jeder Komponente ermittelt. Die, für jede Substanz individuelle Retentionszeit, wird dadurch bestimmt, wann die jeweilige Substanz die Säule verlässt und den Detektor passiert. Zusätzlich erhält man Informationen über das UV-Chromatogramm, welches ebenfalls für jede Substanz spezifisch ist. Besonders UV-aktiv sind hierbei Substanzen, die Aromaten, Doppel- und/oder Dreifachbindungen enthalten. Die Fraktionierung des antimikrobiell aktiven Rohextraktes fand parallel in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte statt, wobei der Injektor alle 30 sek. zu der nächsten Vertiefung wechselte. Nach Abschluss der Messung wurde die Platte mit flüssigem Stickstoff bei 40 °C getrocknet, mit dem vorher gehemmten Testorganismus beimpft und über Nacht bei der entsprechenden Inkubationstemperatur auf dem Mikrotiterplattenschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten visuell ausgewertet und die Vertiefungen ermittelt, in denen das Wachstum der Testorganismen gehemmt wurde (klare Vertiefung). Diese konnten dann einer Retentionszeit und den dort befindlichen Peaks zugeordnet werden. In einer anschließenden HPLC mit angeschlossenen Massenspektrometer (HPLC-HRESIMS) wurden die Extrakte erneut vermessen, um die für die Aktivität verantwortlichen Substanzen mittels des Masse-zu-

Ladungs-Verhältnisses zu identifizieren und zu quantifizieren. Anhand des Abgleichs aller Daten (biologische Aktivität, Retentionszeit, UV, Masse und Produzentenstamm) mit den Informationen aus einer internen Datenbank (Myxobase), kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die ermittelten Substanzen bereits bekannt sind.

Es wurde eine ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ Säule (50 x 2,1 mm) der Firma Waters GmbH, Eschborn, Deutschland, verwendet. Als Lösungsmittel A diente 0,1 %ige Methansäure (in H₂O). Als Lösungsmittel B wurde 0,1 %ige Methansäure (in Acetonitril) verwendet. Die Einstellungen für das Gradientensystem waren 5 % Lösungsmittel B für 30 s, aufsteigend zu 100 % in 19,5 min und anschließend für 5 min gleichbleibend bei 100 %, bei einer Temperatur von 40° C. Die Flussrate betrug 0,6 ml/ min. Die UV-Detektion fand in einem Wellenlängenspektrum zwischen 200 und 600 nm statt. Die Molekularformeln wurden durch den SmartFormula[®] Algorithmus mit der Standardsoftware der Firma Bruker, berechnet.

Die HPLC-HRESIMS-Messungen und -Auswertungen wurden von Cäcilia Schwager und Dr. Sabrina Karwehl aus der AG MISG durchgeführt.

2.2.3 Matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion und Massenspektrometrie

Bei der MALDI-TOF, gekoppelt mit Massenspektrometrie, können Bakterienisolate schnell und zuverlässig phylogenetisch eingeordnet werden. Als Basis dafür dient das jeweilige ribosomale Proteinmuster, welches mittels dieser Methode bestimmt und anschließend mit vorhandenen Proteinmustern von Referenzstämmen aus einer Datenbank abgeglichen wird (Karas & Hillenkamp 1988). In einem dreistufigen Prozess wird die Probe zunächst auf einem Träger platziert und mit einer Matrix überschichtet. Der nächste Schritt beinhaltet den Beschuss der in der Matrix eingebetteten Probe mit einem hochenergetischen UV Laser und die daraus resultierende Desorption, d.h. Übergang in die Gasphase, der Proteine und Peptide der Zellbestandteile. Die so entstandenen Kationen werden im MS beschleunigt und gelangen in den TOF-Analysator (s. Abb. 9). Anschließend kann das Spektrum, welches Aufschluss über die Masse und Flugzeit der bakterienstammspezifischen Proteine gibt, mittels Referenzspektren von nahen Verwandten analysiert werden.

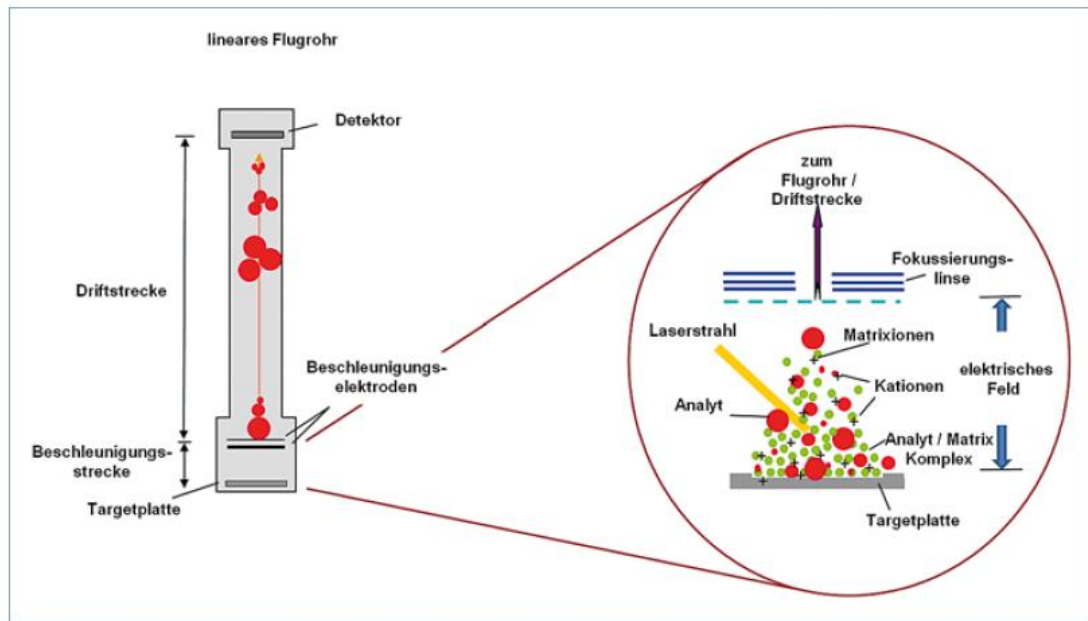


Abbildung 9 Schematische Darstellung einer MALDI-TOF Analyse (Schubert *et al.* 2010)

2.2.3.1 Probenvorbereitung für MALDI-TOF/MS

Die MALDI-TOF/MS-Messung wurde mit allen 73 Stämmen durchgeführt. Aus einer Vorkultur in M Medium wurden 1 ml Zellsuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 13500 rpm wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml dH₂O resuspediert, um die Zellmasse von Medienbestandteilen zu reinigen. Anschließend wurde die Suspension erneut bei 13500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Reinigungsschritt wurde wiederholt. Das Zellpellet wurde in 300 µl dH₂O und mit einem sterilen Pistill homogenisiert. Danach wurden 900 µl Ethanol (absolut) dazugegeben. Die Proben wurden am Helmholtz Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) von Fabienne Hennessen vermessen.

2.2.4 Enzymaktivitätstest APIZYM®

Mit Hilfe der APIZYM® (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) Teststreifen können die Enzymaktivitäten von Mikroorganismen oder Zellen halbquantitativ mittels Farbnachweis analysiert werden (Humble *et al.* 1977). Der Nachweis dient zur Untersuchung und schnellen

Diagnostik des Spektrums verschiedener Enzymaktivitäten unterschiedlicher biologischer Materialien (s. Tab. 5).

Tabelle 5 Nachweisspektrum des APIZYM® Enzymtests

Nr.	Enzymnachweis	Substrat
1	Negativkontrolle	/
2	Alkalische Phosphatase	2-Naphtylphosphat
3	Esterase (C4)	2-Naphtylbutyrat
4	Esterase-Lipase (C8)	2-Naphtylcaprylat
5	Lipase (C14)	2-Naphtylmyristat
6	Leucin-Arylamidase	L-leucyl-2-naphtylamid
7	Valin-Arylamidase	L-valyl-2-naphtylamid
8	Cytine arylamidase	L-cystyl-2-naphtylamid
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginin-2-Naphtylamid
10	Chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanin-2-Naphtylamid
11	Saure Phosphatase	2-Naphtylphosphat
12	Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-Phosphat
13	α -Galactosidase	6-Br-2-naphtyl- α D-Galactopyranosid
14	β -Galactosidase	2-Naphtyl- β D-Galactopyranosid
15	β -Glucuronidase	Naphtyl-AS-BI- β D-Glucuronid
16	α -Glucosidase	2-Naphtyl- α D-Glucopyranosid
17	β -Glucosidase	6-Br-2-naphtyl- β D-Glucopyranosid
18	N-acetyl- β -Glukosaminidase	1-Naphtyl-N-acetyl- β D-Glukosaminid
19	α -Mannosidase	6-Br-2-naphtyl- α D-Mannopyranosid
20	α -Fucosidase	2-Naphtyl- α L-Fucopyranosid

Ein Teststreifen besteht aus zwanzig Mikroküvetten, welche das jeweilige Enzymsubstrat und den dazugehörigen Puffer enthalten. Die Vertiefungen in den Streifen wurden mit Zellsuspension befüllt und in einer Inkubationskammer, bestehend aus einer Inkubationswanne mit Deckel in feuchtem Milieu, für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Für die Probenvorbereitung wurde nur eine geringe Menge an Zellmaterial benötigt. Aus einer Vorkultur in CY/H Medium wurden 1 ml Zellsuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 13500 rpm wurde der

Überstand abgenommen und auf das Zellpellet wurde 1 ml dH₂O gegeben um es zu resuspendieren und von Medienbestandteilen zu reinigen. Anschließend wurde die Suspension erneut bei 13500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Reinigungsschritt wurde wiederholt. Das Zellpellet wurde in 300 µl dH₂O mit einem sterilen Pistill homogenisiert.

Für die Vorbereitung der Inkubationskammern wurden die Vertiefungen der Inkubationswannen mit dH₂O befüllt. Anschließend wurden je 100 µl der homogenisierten Zellsuspension in die einzelnen Vertiefungen des Teststreifens gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden je ein Tropfen ZYM A[®] sowie ZYM B[®] Reagenz in die Mikroküvetten gegeben. Die Inkubationskammern wurden zur Ausbildung der Farbreaktion 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Dokumentation wurden die Streifen anschließend fotografiert. Die Auswertung erfolgte über die Intensität der Farbreaktionen in den Mikroküvetten (s. Abb. 10).

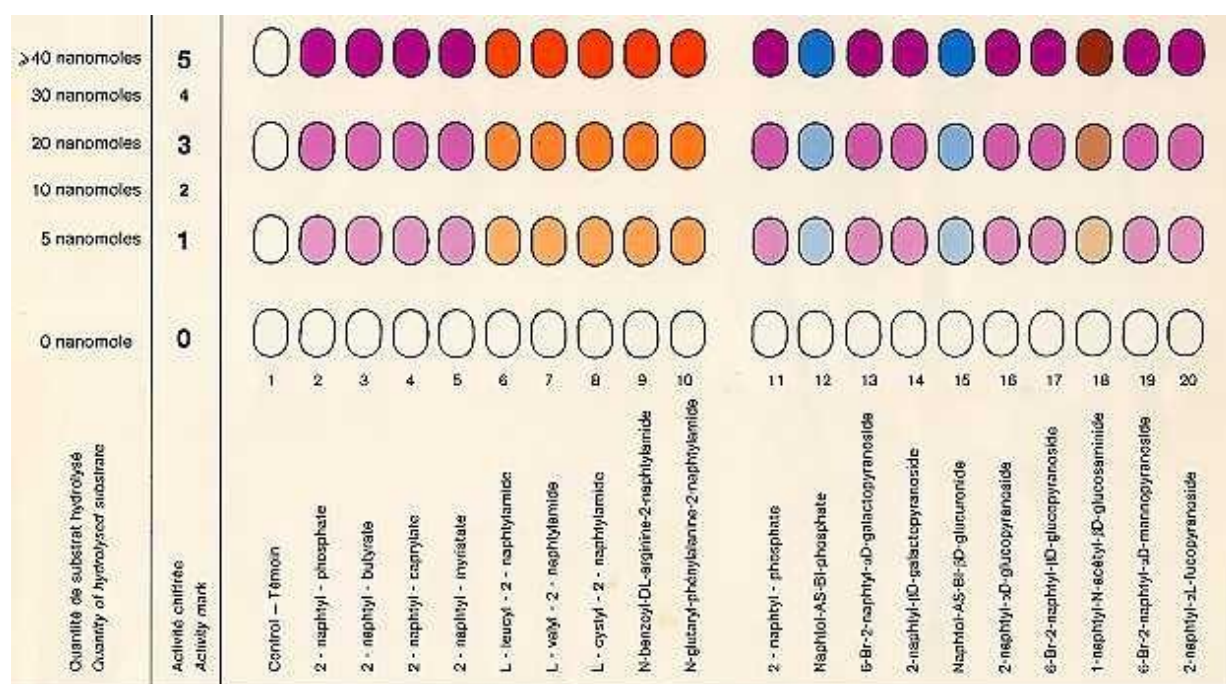


Abbildung 10 Auswertungstabelle für den Nachweis der jeweiligen Enzymaktivitäten

2.2.5 Fettsäureanalysen

2.2.5.1 Probenvorbereitung für die FAME Methode

Die Erstellung der Fettsäureprofile wurde am Helmholtz Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland durchgeführt. Die zellulären Fettsäuren wurden mit der FAME (*fatty acid methyl ester*, Fettsäuremethylester) Methode nach Bode *et al.* 2006 extrahiert. Hierzu wurden 50 mg getrocknete Zellmasse, welche zuvor in hefefreiem M Medium angezogen wurde, in 500 µl einer Lösung aus Methanol, Toluol und Schwefelsäure (50:50:2, v/v/v) in einem 1 ml Glasreaktionsgefäß mit Schraubverschluss resuspendiert und über Nacht bei 80 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 400 µl einer wässrigen Lösung aus 0,5 M NH_4HCO_3 und 2 M KCl versetzt und 30 s gevortext. Um eine Phasentrennung herbeizuführen, wurde die Probe bei Raumtemperatur bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden 75 µl der oberen Phase abgenommen und mit 25 µl MSTFA versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Anschließend konnte die Probe mittels Gaschromatografie mit Massenspektrometrie (GC-MS) vermessen werden.

2.2.5.2 Analyse der Fettsäuren mittels GC-MS

Die GC-MS wurde am HIPS in Saarbrücken von Dr. Katja Gemperlein an einem Agilent 6890N Gaschromatograph mit einem elektronenstoßmassensensitiven Detektor des Typs 5973 (Agilent) und einem Injektor des Typs 7683B (Agilent) in einer Dimethyl-(5 % phenyl)-polysiloxan Kapillarsäule (Agilent DB-5ht) durchgeführt. Als Trägergas mit einer Fließrate von 1 ml/min wurde Helium verwendet. 5 µl der Probe wurden in mehreren Schritten injiziert. Die Säulentemperatur wurde für 2,5 min bei 130 °C gehalten, erhöht auf 240 °C bei einem Intervall von 5 °C/min und anschließend erneut erhöht auf 300 °C bei einem Intervall von 30 °C/min. Diese Temperatur wurde für 5 min beibehalten. Die Temperatur des Inlets betrug 275 °C, die der GC-MS Übertragungsleitung 280 °C, die der Ionenquelle 230 °C und die des Quadrupols 150 °C. Der Massenselektive Detektor wurde im "scan mode" betrieben und untersuchte den Massenbereich 40 bis 700 m/z . Kontrolle des Scans, Datenerstellung und Prozessierung wurden mittels MSD ChemStation und AMDIS Software (Version 2.68) durchgeführt. Diese basieren auf den Fragmentierungsmustern und Retentionszeiten.

2.2.6 Phospholipidanalyse

Die Phospholipidisolation und –analyse wurde nach Collins *et al.* (1980) und Minnikin *et al.* (1979) am Leibnitz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll Institut, in der Abteilung Biotechnikum in Jena, mit den 15, in dieser Arbeit neu definierten Typtämmen der Gattung *Sorangium*, durchgeführt. Phospholipide sind fluiditätsbeeinflussende Membranbestandteile von prokaryotischen Zellen und werden in Sphingolipide und Glycerophospholipide unterschieden. Durch eine Veresterung des Glycerophospholipids Phosphatidsäure mit der Hydroxygruppe mit anderen Molekülen wie Ethanolamin, Cholin, Inositol oder Serin, entstehen Phosphorsäurediester wie Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin. Wie im Folgenden beschrieben, wurden die Phospholipide aus der bakteriellen Membran gelöst, mittels 2D-Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und durch unterschiedliche Nachweisreagenzien sichtbar gemacht.

Die charakteristische Phospholipidzusammensetzung der Bakterienmembran aus den verschiedenen Phospholipidtypen eignet sich für eine chemotaxonomische Klassifizierung einzelner Bakteriengattungen und –spezies (Minnikin *et al.* 1977, Kroppenstedt 1986).

2.2.6.1 Gewinnung der Biomasse

Die 15 putativen Typtämme wurden, in einem standardisierten Verfahren, in 100 ml M Medium sieben Tage bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Wie in 2.2.4 beschrieben, wurde die Zellmasse geerntet, gewaschen und lyophilisiert. Anschließend wurden 50 mg der getrockneten Biomasse abgewogen und für die Phospholipidanalyse verwendet.

2.2.6.2 Extraktion der Phospholipide

50 mg der getrockneten Zellmasse wurden in ein 10 ml Glasröhrchen mit Schraubverschluss gegeben und mit 6,75 ml einer Chloroform-Methanol-NaCl (0,3 %)-Lösung versetzt (50-100-

40 v/c). Um die Phospholipide aus den Zellen zu extrahieren, wurde das Gemisch für 4 Stunden bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler geschüttelt. Anschließend wurden die Röhren für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt. Es wurden 1,75 ml Chloroform sowie 1,75 ml 0,3 % NaCl hinzugegeben und invertiert. Die untere Phase des Gemisches wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 10000 rpm abgenommen und abermals in ein neues Röhrchen überführt. Die erhaltene Flüssigkeit wurde mit Hilfe von Druckluft eingengt. Für die folgende Chromatographie wurde der Extrakt in 100 µl Chloroform-Methanol (2-1-v/v) gelöst.

2.2.6.3 2D-Dünnschichtchromatographie der Phospholipide

Bei der DC wird ein Extrakt auf einen Träger aus Kieselgel, die sogenannte stationäre Phase, aufgetragen und anschließend in zwei Fließdurchgängen in seine einzelnen Komponenten aufgetrennt. Dazu werden stark polare Lösungsmittel verwendet, die mobilen Phasen, um die im Extrakt enthaltenen Moleküle durch Kapillarkräfte anhand ihrer Ladung und Größe und der damit verbundenen unterschiedlichen Laufeigenschaften im Lösungsmittel voneinander zu separieren.

Mittels Kapillarröhrchen wurden 10 µl des Chloroform-Methanol-Extraktes aufgenommen und in eine Ecke einer 10 x 10 cm Kieselgelplatte (HPTLC Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt) mit einem, möglichst kleinen, Radius aufgetropft. Der Abstand zum Rand der Platte betrug hierbei jeweils 1 cm (s. Abb. 11).

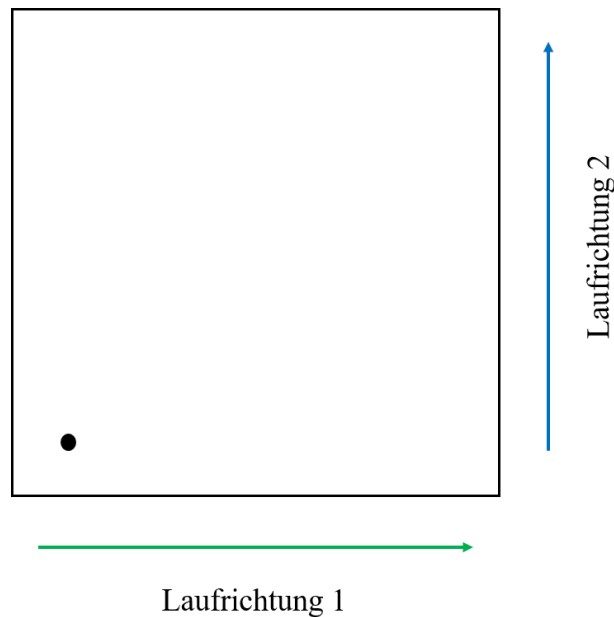


Abbildung 11 Schematische Darstellung einer Kieselgelplatte und Laufrichtungen der Lösemittel.

Für den ersten Lauf wurden 80 ml eines Chloroform-Methanol-Wasser Gemisches (65 ml/ 25 ml/ 4 ml) in die Laufkammer aus Glas gegeben. Anschließend wurden die Kieselgelplatten senkrecht in die Laufkammer gestellt. Die Platten wurden, nachdem das Lösungsmittel ca. 1 cm Abstand vom oberen Rand der Kieselgelplatte erreicht hat, entnommen und unter dem Abzug für ca. 10 min getrocknet. Danach wurden die Platten gedreht und in eine Laufkammer mit 80 ml des zweiten Laufmittels, bestehend aus Chloroform, Eisessig, Methanol und Wasser (80 ml/ 12 ml/ 15 ml/ 4 ml), überführt. Die Platten wurden erneut entnommen, nachdem das Laufmittel, mit ca. 1 cm Abstand, den oberen Rand der Platte erreicht hat. Die Kieselgelplatten mit den aufgetrennten Lipiden wurden unter dem Abzug getrocknet. Pro Stamm wurden auf diese Weise jeweils zwei Kieselgelplatten für die folgenden Nachweisreaktionen angefertigt.

2.2.6.4 Nachweisreaktionen mittels Sprühreagenzien

Um die Phospholipidzusammensetzung der Stämme zu analysieren, wurden insgesamt vier Nachweisreaktionen durchgeführt. Für eine Gesamtfärbung aller Lipide wurde auf die Kieselgelplatte gleichmäßig Molybdätophosphorsäure gesprüht und anschließend auf einer Heizplatte für 5 min auf 160 °C erhitzt, um die Punkte der Lipide auf der Platte sichtbar zu machen. Die Punkte erscheinen schwarz (s. Abb. 12).

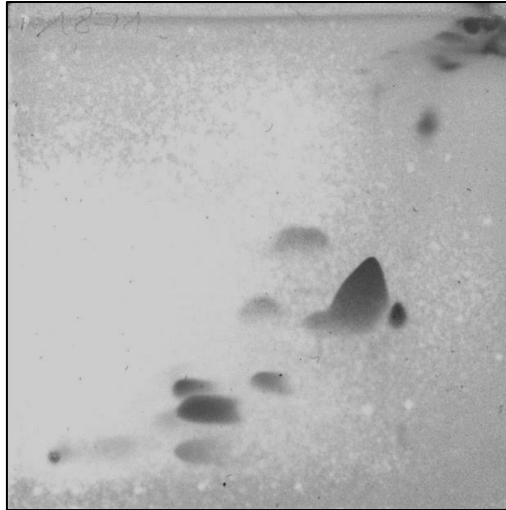


Abbildung 12 Nachweis der Gesamtlipide mit Molybdatophosphorsäure am Beispiel von *S. cellulosum* 1871 nach der DC auf einer Kieselgelplatte.

Der Nachweis für die zweite Kieselgelplatte wurde zunächst mit einem Ninhydrin-Reagenz durchgeführt, welche Lipide mit einer freien Aminogruppe als roten Punkt sichtbar machte (s. Abb. 13). Dazu wurden die Platten gleichmäßig mit dem Reagenz besprüht und auf einer Heizplatte für 5 min bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurden die Platten fotografiert und für den Nachweis mit dem Dittmer-Lester-Reagenz weiterverwendet.

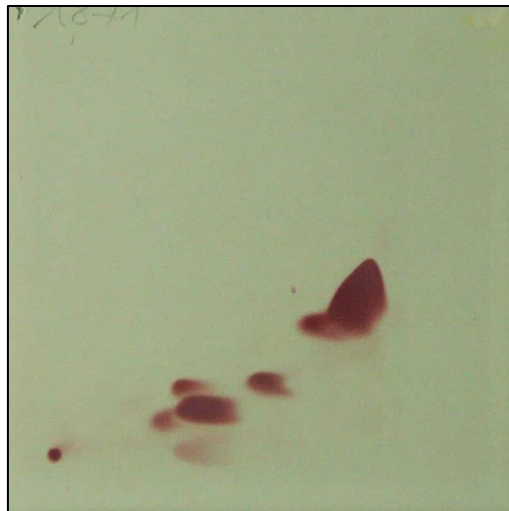


Abbildung 13 Ninhydrin-Nachweis auf einer Kieselgelplatte am Beispiel von *S. cellulosum* 1871. Die Lipide mit freier Aminogruppe erscheinen als rote Punkte.

Als Sprühsubstanz dient hierbei Molybdänblau, das die Phospholipide anhand der Phosphatgruppen detektiert. Die Punkte erscheinen blau. Die Kieselgelplatten wurden erneut dokumentiert (s. Abb. 14).



Abbildung 14 Nachweis der Phosphatgruppen mit dem Dittmer-Lester-Reagenz. Die Phospholipide sind als blaue Punkte auf der Kieselgelplatte sichtbar.

Dieselbe Platte wurde anschließend für den vierten Nachweis, den Nachweis aller organischen Moleküle, auf 150 °C erhitzt. Die organischen Moleküle erschienen als braune Punkte (s. Abb. 15).

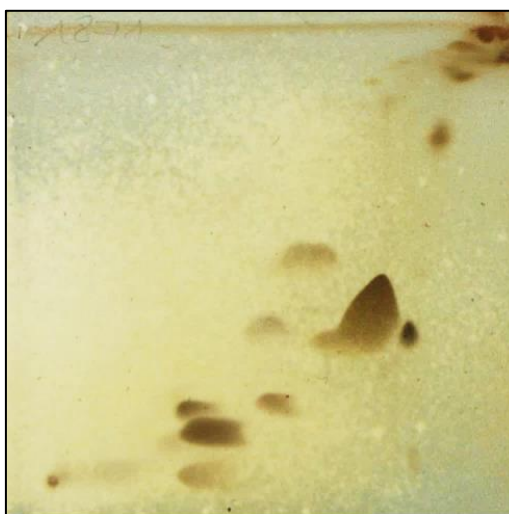


Abbildung 15 Nachweis der organischen Moleküle durch Erhitzen dem Dittmer-Lester-Reagenz auf der Kieselgelplatte am Beispiel von Soce 1871. Alle organischen Molekülgruppen erscheinen braun.

Nach einer erneuten Dokumentation der Kieselgelplatte können die unterschiedlichen Phospholipidmuster der verschiedenen Stämme verglichen werden. Die Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die detektierbaren Molekülgruppen mittels der vier Nachweisschritte.

Tabelle 6 Farbnachweis der Phospholipide

Moleküle	Abkürzung	Platte 1	Platte 2		
		Molybdato-phosphorsäure	Ninhydrin-Reagenz	Dittmer-Lester-Reagenz	Erhitzen auf 150 °C
Phosphatidylethanolamin	PE	x	x	x	x
Phosphatidylhydroxyethanolamine	PE-OH	x	x	x	x
Phosphatidylglycerol	PG	x		x	x
Disphosphatidylglycerol	DPG	x		x	x
Phosphatidylcholin	PC	x		x	x
Phosphatitylinositol	PI	x		x	x
Phosphatidylinositolmannosid	PIM	x		x	x
Sphingoglycolipid	SGL	x			x
Phosphatidyl-N-methylethanolamin	PME	x	x	x	x
Phosphatidyl dimethylethanolamin	PDME	x	x	x	x
unbekanntes Phospholipid	PL	x		x	x
unbekanntes Phosphoglycolipid	PGL	x		x	x
unbekanntes polares Lipid	L	x			x
unbekanntes Glycolipid	GL	x			x
glukosaminhaltige Lipide	GAL	x			x
Phosphatidylserin	PS	x	x	x	x

2.2.7 DNA Isolation

Die genomische DNA diente als Grundlage für die genom-basierten Untersuchungen. Für die Isolation wurden 2 ml einer Kultur von *S. cellulorum*, gewachsen in CY/H Medium, entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13500 rpm. Anschließend wurde der Überstand verworfen und es wurde 1 ml steriles dH₂O hinzugefügt. Nach der Wiederholung des Reinigungsschrittes wurde der Überstand erneut verworfen.

Die Extraktion der DNA wurde mit dem Invisorb® Spin Plant Mini Isolationskit der Firma Stratec Molecular durchgeführt. Zu der Zellmasse in dem 2 ml Reaktionsgefäß wurden 200 µl Lysispuffer gegeben. Zum erleichterten Zellaufschluss wurde die Zellmasse anschließend für 1-3 min mit einem sterilen Pistill homogenisiert. Danach wurden 20 µl Proteinase K und weiter 200 µl Lysispuffer hinzugegeben. Nach dem Vortexen des Gemisches folgte eine Inkubation bei 65 °C für 60 min in einem Thermoschüttler. Das Gemisch wurde anschließend in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß mit einem *Prefilter* überführt und für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Der *Prefilter* wurde entsorgt und die Lösung mit 200 µl Bindungspuffer A versetzt und gevortext. Die Suspension wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit *Spin Filter* gegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 11000 rpm für 2 min. Die genomische DNA war nun an der Membran des *Spin Filters* gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden 550 µl Waschpuffer I hinzugefügt und bei 11000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt und es folgte ein weiterer Waschschrift mit Waschpuffer II. Das Reaktionsgefäß wurde bei 11000 rpm für 1 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde erneut durchgeführt. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde der Filter zur Trocknung für 4 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Spin Filter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Filtermembran wurde mit 30 µl eines auf 65 °C erwärmten Elutionspuffer benetzt. Zum Lösen der DNA aus der Filtermembran wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 10000 rpm. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoPhotometer™ (Implen GmbH, München, Deutschland) bestimmt. Die DNA wurde anschließend bei -20 °C bis zu den weiterführenden Analysen gelagert.

2.2.7.1 Amplifizierung des 16S rRNA-Gens

Die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens wurde mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Bei der PCR wurden spezifische Primer verwendet, welche an das anzureichernde Gen innerhalb eines Gemisches aus genomischer DNA selektiv binden (s. Tab. 7). Durch Zugabe einer Polymerase und eines Gemisches der Nukleinbasen wird der Genabschnitt durch Hybridisierung, Elongation und Denaturierung vervielfältigt.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der JumpStart™ ReadyMix™ (JSRM) der Firma Sigma-Aldrich verwendet, welcher aus Puffer, Magnesiumchlorid, Desoxyribonukleosid-triphosphaten (dNTPs) und der *Taq*-Polymerase besteht.

Tabelle 7 Primer für die PCR des 16S rRNA-Gens

Bezeichnung	Sequenz	Position	Referenz
F27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	8-27	Heuer <i>et al.</i> (1997)
R1492	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3'	1513- 1492	Heuer <i>et al.</i> (1997)

Pro DNA-Probe wurde ein PCR-Reaktionsmix in einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß aus Plastik vorgelegt. Für eine optimale Bindungskapazität wurde die genomische DNA aus 100 nmol/ µl verdünnt.

Reaktionsmix (50 µl)

25 µl	JSRM
1 µl	F27 (100 pmol/µl)
1 µl	R1492 (100 pmol/µl)
1 µl	DNA-Probe (100 nmol/µl)
22 µl	dH ₂ O

Die PCR fand anschließend in einem Thermocycler des Typs Mastercycler Gradient der Marke Eppendorf statt (s. Tab. 8). Zusätzlich zu den DNA Proben wurde bei jedem Programmdurchlauf eine Negativkontrolle, die den Reaktionsmix ohne genomische DNA beinhaltet, beigeführt, um eine mögliche Kontamination der Reaktionsmixkomponenten auszuschließen.

Tabelle 8 PCR-Programm für die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens

	Temperatur	Zeitintervall	Phase
	95°C	5 min	Aktivierung der Polymerase
34 x {	94°C	30 sec	Denaturierung
	52°C	30 sec	Hybridisierung
	72°C	2 min	Elongation
	72°C	10 min	Beendigung Der Elongation
	4°C	∞	Lagerung

Nach der PCR wurden die Proben zur Identifikation und Visualisierung des PCR-Produktes auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei der Gelelektrophorese wird die negativ geladene DNA durch das Anlegen eines Spannungsfeldes ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurde ein Plastikträger für das Agarosegel in einer Gießkammer mit 30 ml einer heißen, 0,8 %igen Agaroselösung befüllt und mit einem Kamm versehen. Nach Aushärtung des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer überführt. Anschließend wurde die Kammer mit fünffach TAE-Puffer aufgefüllt und der Kamm wurde aus dem Gel entfernt. Die dadurch entstandenen Geltaschen wurden anschließend mit je 2 µl des PCR-Produktes und 2 µl Gelstar™, ein Gemisch, das Ladepuffer und Ethidiumbromid enthält, befüllt. Als Marker diente der 1 kb Marker von New England Biolabs.

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel für 45 min bei 80 V an eine Stromquelle angeschlossen.

Die Banden wurden anschließend mittels UV-Licht in einem UV-Transilluminator der Marke Herolab sichtbar gemacht. Das Gel wurde dokumentiert.

2.2.7.2 Aufreinigung des 16S rRNA Genfragments

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kit von Macherey-Nagel verwendet.

Hierzu wurden die verbleibenden 48 µl pro PCR-Probe mit je 100 µl NTI Puffer versetzt. Dies schafft die Voraussetzungen für eine anschließende Bindung der DNA an die Auffangsäule. Danach wurde das gesamte Gemisch in eine NucleoSpin Säule in einem 2 ml Auffanggefäß gegeben und für 30 sec bei 11000 rpm zentrifugiert. Zur Reinigung der an die Membran der Säule gebundenen DNA wurden 700 µl NT3 Puffer auf die Säule gegeben. Es wurde erneut für 30 sec bei 11000 rpm zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt. Für die Trocknung der Membran wurde die Säule anschließend für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Für die Eluierung der DNA von der Membran wurde die Säule in ein frisches, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die Membran mit 30 µl NE Puffer benetzt und bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 1 min bei 11000 rpm wurde die Konzentration des PCR Produktes fotometrisch vermessen und für nachfolgende Untersuchungen bei -20 °C gelagert.

Für die anschließende Sequenzierung der DNA-Fragmente wurden die gereinigten PCR-Produkte erneut auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde für 45 min bei 80 V an das Netzgerät angeschlossen. Anschließend wurden die betreffenden Banden, das 16S rRNA-Genfragment ist 1505 bp groß, unter UV-Licht zur Visualisierung, mit Hilfe eines sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde das Gelfragment gewogen, um anschließend pro 100 mg Agarosegel 200 µl NTI Puffer in das 1,5 ml Reaktionsgefäß zu geben. Die Proben wurden für 10 min bei 50 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert, um das vollständige Auflösen des Gelfragmentes zu gewährleisten. Die Lösung wurde im Anschluss auf eine NucleoSpin® Säule innerhalb eines 2 ml Auffanggefäßes gegeben. Das Gefäß samt Säule wurde 30 sec bei 11000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 700 µl ethanolhaltigen NT3 Puffers zur Reinigung der DNA auf die Säule gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 30 sec bei 11000 rpm. Der Waschschrift wurde wiederholt. Für die Trockenlegung der Membran, an der die DNA-Fragmente gebunden sind, wurde die Säule ein weiteres Mal für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Für die anschließende Eluierung der DNA wurden 30 µl NE

Puffer auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationsperiode von 1 min bei Raumtemperatur wurde die Säule bei 11000 rpm für 1 min zentrifugiert.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in der Arbeitsgruppe Genomanalytik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung mittels HT-Kapillarsequenzierung (96-plex Sanger-Sequenzierung) mit dem *Capillary DNA Analyzer* ABI 3730xl96 des Herstellers Thermo Fisher Scientific sequenziert. Es folgte eine Assemblierung der Rohsequenzen mit der Software Sequencher 5.4 der Firma Gene Codes Corporation (Michigan, USA). Die erhaltenen Gensequenzen konnten anschließend für die phylogenetischen Analysen verwendet werden.

2.2.7.3 Amplifizierung von *xynB1*

Für den Vergleich der Sequenz des Zellulasegens *xynB1* wurde ein 525 bp langer Abschnitt des *xynB1* Gens mittels PCR amplifiziert. Die PCR wurde in der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Genomforschung“ von Prof. Dr. Ulrich Nübel an der DSMZ in Braunschweig durchgeführt.

Tabelle 9 Primersequenzen für die Amplifikation von *xynB1*

Bezeichnung	Sequenz	Position	Referenz
<i>xynB1</i> -F	5' GGCTTCGGCTACTTCTCGTG 3'	1-20	Lee <i>et al.</i> (2011)
<i>xynB1</i> -R	5' CGTCCACCGACCAGTTCATC 3'	505-525	Lee <i>et al.</i> (2011)

Für die PCR-Reaktion wurde für jede DNA-Probe ein Reaktionsmix (25µ) hergestellt. Es wurde der DreamTaq Green PCR Master-Mix (DTGM) der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Dieser enthält DreamTaq Polymerase, DreamTaq Pufferm dNTPs und 4 mM Magnesiumchlorid.

Reaktionsmix (25 µl)

12,5 µl	DTGM
0,5 µl	<i>xynBI</i> -F (25 µM)
0,5 µl	<i>xynBI</i> -R (25 µM)
1 µl	DNA-Probe (100 nmol/µl)
10,5 µl	dH ₂ O

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Applied Biosystems, Typ Veriti, mit einer Negativkontrolle durchgeführt (s. Tab. 10).

Tabelle 10 PCR-Programm für die Amplifizierung von *xynBI*

	Temperatur	Zeitintervall	Phase
	95°C	3 min	Aktivierung der Polymerase
35 x {	95°C	30 sec	Denaturierung
	55°C	30 sec	Hybridisierung
	72°C	60 sec	Elongation
	72°C	10 min	Beendigung Der Elongation
	4°C	∞	Lagerung

2.2.7.4 Amplifizierung von *groEL1*

Für den Vergleich der Sequenz des Gens *groEL1* wurde ein 450 bp langer Genabschnitt mittels PCR amplifiziert. Die PCR wurde in der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Genomforschung“ der DSMS von Prof. Dr. Ulrich Nübel in Braunschweig durchgeführt.

Tabelle 11 Primersequenzen für die Amplifikation von *xynB1*

Bezeichnung	Sequenz	Position	Referenz
<i>groEL1-F</i>	5'ACGACGACGGCGACSGTGCTSGC 3'	1-23	Lee <i>et al.</i> (2011)
<i>groEL1-R</i>	5'TCGCCRAAGCCGGGGGCGYTTTAC 3'	427-450	Lee <i>et al.</i> (2011)

Für die PCR-Reaktion wurde für jede DNA-Probe ein Reaktionsmix (25 µl) hergestellt. Es wurde der DreamTaq Green PCR Master-Mix (DTGM) der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Dieser enthält DreamTaq Polymerase, DreamTaq Puffer, dNTPs und 4 mM Magnesiumchlorid.

Reaktionsmix (25 µl)

12,5 µl	DTGM
0,5 µl	<i>groEL1-F</i> (25 µM)
0,5 µl	<i>groEL1-R</i> (25 µM)
1 µl	DNA-Probe (100 nmol/µl)
10,5 µl	dH ₂ O

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Applied Biosystems, Typ Veriti, mit einer Negativkontrolle durchgeführt (s. Tab. 12).

Tabelle 12 PCR-Programm für die Amplifizierung von *groEL1*

	Temperatur	Zeitintervall	Phase
	95°C	3 min	Aktivierung der Polymerase
35 x {	95°C	30 sec	Denaturierung
	59°C	30 sec	Hybridisierung
	72°C	60 sec	Elongation
	72°C	10 min	Beendigung Der Elongation
	4°C	∞	Lagerung

2.2.7.5 Aufreinigung von *xynB1* und *groEL1*

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem QIAquick® Purification Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden je 125 µl Puffer PB1 zu den PCR-Produkten in die 200 µl Reaktionsgefäße gegeben und mit der Pipette gemixt. Die Proben wurden anschließend auf eine QIAquick® Säule in ein 2 ml Auffanggefäß gegeben. Die Säule samt Auffanggefäß wurden zur Bindung der DNA für 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden zur Reinigung 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und erneut für 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Um überschüssigen Waschpuffer von der Membran zu entfernen, wurde die Säule in ein frisches 2 ml Auffanggefäß überführt und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Für die Elution der DNA wurden die Säulen in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Anschließend wurden je 50 µl Elutionspuffer EB (10 Mm TrisCl, pH 8,5) auf die Membranen der Säulen gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die gereinigte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.7.6 Sequenzierung und Assemblierung von dem 16S rRNA-Gen, *xynB1* und *groEL1*

Die gereinigten PCR-Produkte wurden in der Arbeitsgruppe Genomanalytik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung mittels HT-Kapillarsequenzierung (96-plex Sanger-Sequenzierung) mit dem *Capillary DNA Analyzer* ABI 3730xl96 des Herstellers Thermo Fisher Scientific sequenziert. Es folgte eine Assemblierung der Genomdaten mit der Software Sequencher 5.4 der Firma Gene Codes Corporation (Michigan, USA). Die erhaltenen Gensequenzen wurden anschließend für die phylogenetischen Analysen verwendet. Die Bäume wurden mit der Software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version* 6.0 (MEGA6) berechnet und visualisiert.

2.2.7.7 Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Die Sequenzdaten wurden mit der Software MEGA6® aligniert. Nach dem Alignment wurden mit derselben Software die phylogenetischen Stammbäume erstellt.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der unterschiedlichen chemotypischen, genotypischen und phänotypischen Analysen der *Sorangium* Stämme vorgestellt und interpretiert.

Zunächst wurden die 73 randomisiert ausgewählten Stämme auf unterschiedlichen Nährmedium ausplattiert, um die Eigenschaften des Wachstums und die Koloniefarbe des jeweiligen Stammes zu dokumentieren. Die Stämme wurden so ausgewählt, dass möglichst viele verschiedene Ursprungsgebiete repräsentiert werden (s. Abb. 16).

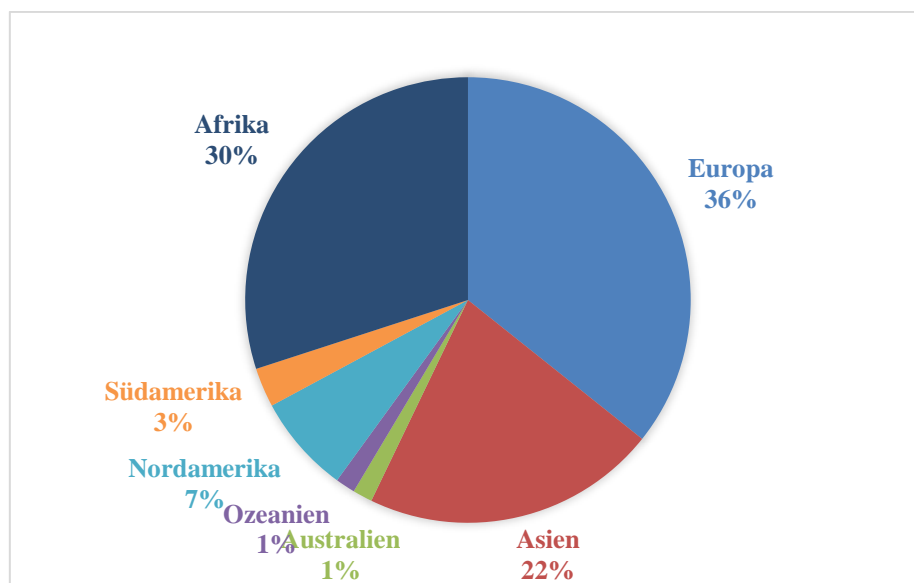


Abbildung 16 Herkunft der untersuchten Stämme der Gattung *Sorangium* in Prozent.

3.1 Morphologische Untersuchung

Zur dauerhaften Kultivierung und zur Bestimmung der morphologischen Eigenschaften wurden die 73 Stämme der Gattung *Sorangium* auf vier unterschiedlichen, festen Medien kultiviert. Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, wurde kryokonservierte Zellmasse auf den unterschiedlichen Medien ausplattiert und für fünf Wochen bei 30 °C inkubiert.

Das Wachstum auf VY/2 zeigte für jeden Stamm charakteristische Merkmale bezüglich des Schwärmens und der Färbung der Stämme und wurde somit als Medium für das repräsentative Stammwachstum ausgewählt. Die Abbildung 17 zeigt exemplarisch 15 unterschiedliche Wachstumsformen der Sorangien.

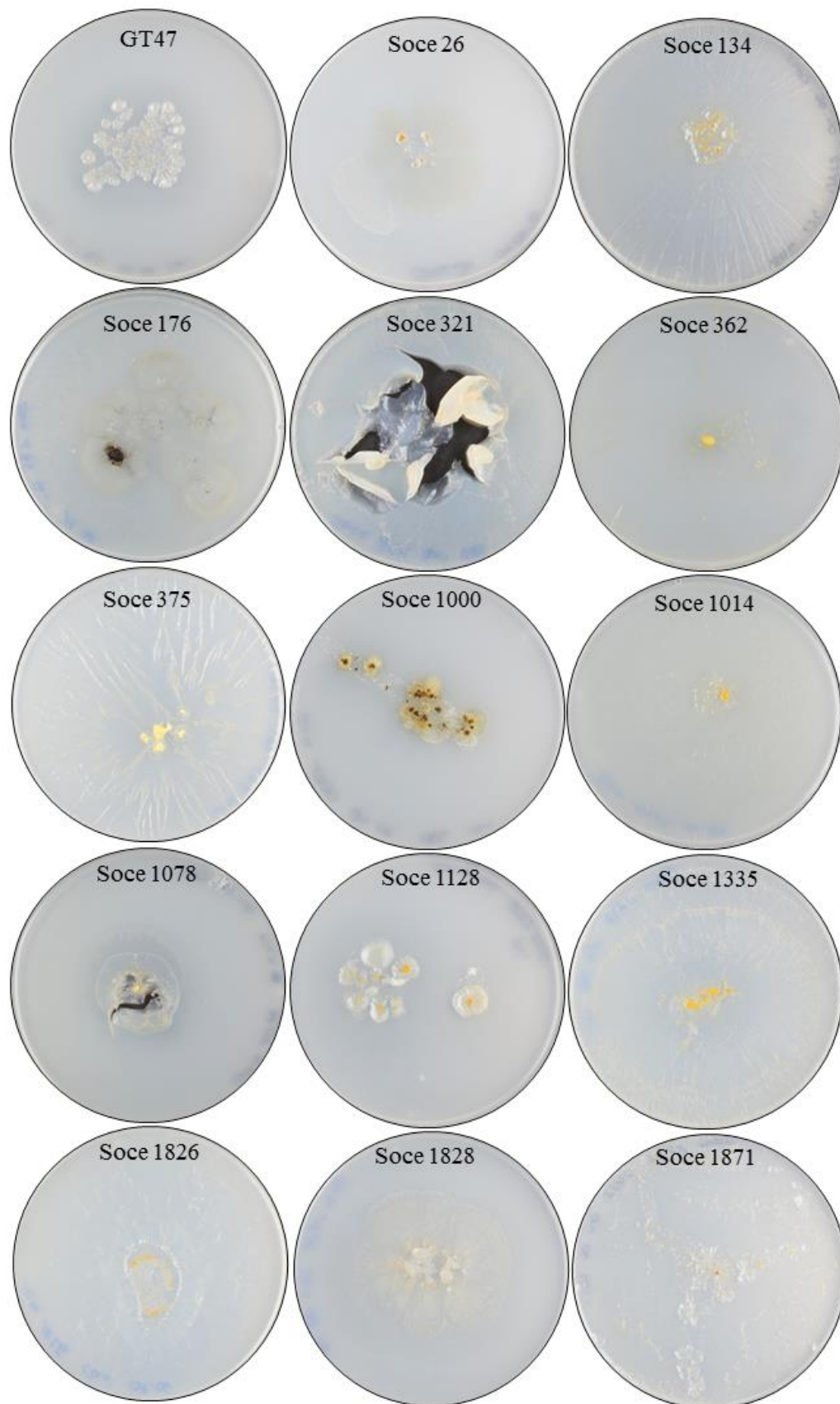


Abbildung 17 Wachstum von *Sorangium* auf VY/2 Nährmedium in Petrischalen aus Polystyrol (94 mm x 16 mm). Die Kolonien schwärmen punktuell-kreisförmig auf der Oberfläche des Mediums (Soce 1128) oder in den Agar hinein (GT 47, Soce 321, Soce 1078, Soce 1128), fächerförmig (Soce 26, Soce 176, Soce 1335, Soce 1828), in Fäden (Soce 362, Soce 1014) oder strahlenförmig (Soce 134, Soce 375).

Das nährstoffreiche P Medium führte zu einem uniformen Wachstumsbild der untersuchten Stämme, hervorgerufen durch ausgeprägte Zellmassenentwicklung (s. Abb. 18).



Abbildung 18 Wachstum der Stämme Soce 134, Soce 204 und Soce 1826 auf P Medium.

Die Kolonien waren hellgelb bis leuchtend orange und es war kein Schwärmverhalten zu beobachten. Diese Art des Wachstums auf nährstoffreichen Medien ist typisch für Myxobakterien.

Die Gattung *Sorangium* hebt sich, zusammen mit der Gattung *Byssovorax*, durch die Fähigkeit, Zellulose als Energiequelle zu verwerten, von den anderen, bisher bekannten, Myxobakterien ab. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Stämme auf Stan21 Agar ausplattiert, auf dem sich mittig ein ca. 1,5 cm x 1,5 cm großes Stück autoklaviertes Filterpapier, zusätzlich zu einem geringen Anteil an Hefeextrakt, als Nahrungsquelle befand. Alle 73 Stämme haben das Filterpapier als Nahrungsquelle verwertet und sich vermehrt (s. Abb. 19).

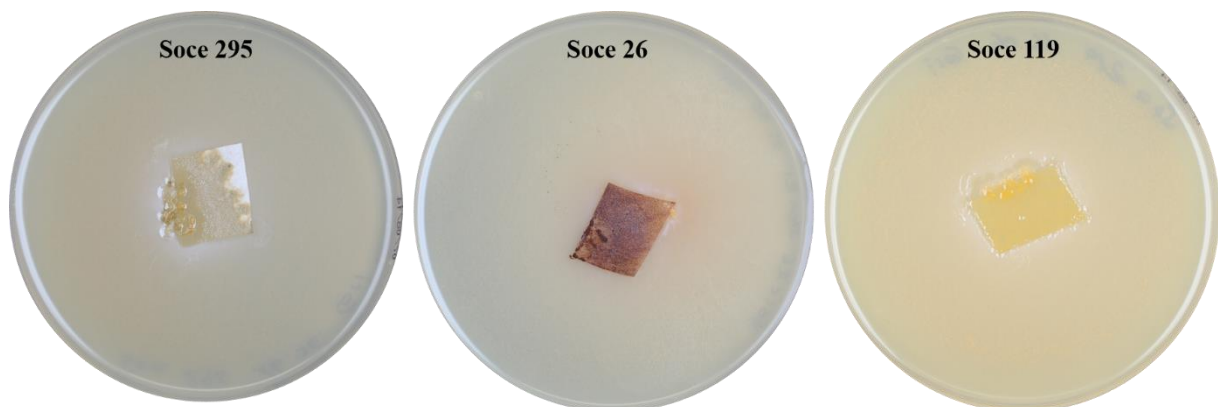


Abbildung 19 Wachstum von *Sorangium cellulosum* auf Stan21 Medium mit Zellulose als Nahrungsquelle.

Die Kultivierung auf Wasseragar mit der Zugabe von autoklavierten *E. coli* Zellen als Nahrungsquelle, diente zur dauerhaften Erhaltung der Stämme und wurde nicht für den morphologischen Vergleich der Stämme herangezogen.

Die unterschiedlichen Farbvarianten der Gattung *Sorangium* sind in Abbildung 20 dargestellt. Insgesamt zeigten sich während der Kultivierung eine Vielzahl an Farbschattierungen der Kolonien Kolonien und Fruchtkörper.

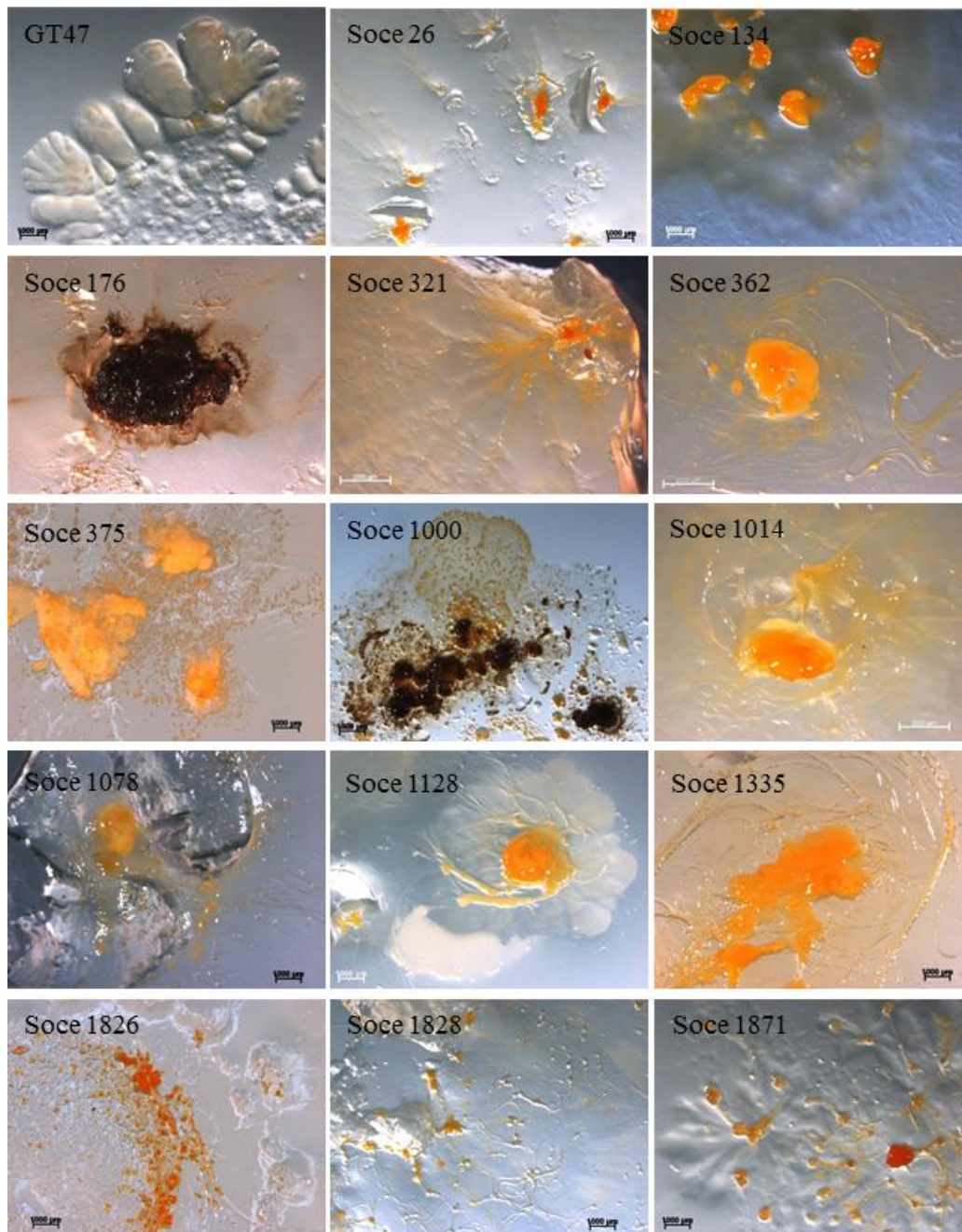


Abbildung 20 Wachstum von *S. cellulosum* auf VY/2. Stereomikroskopische Aufnahmen. Die Farbvarianzen der Kolonien reichen von farblos-blassorange (GT47) über gelb-orange (Soce 362, Soce 375, 1078) orange (Soce 26, Soce 134, Soce 321, Soce 1014, Soce 1128, Soce 1335, Soce 1826, Soce 1828, Soce 1871) bis hin zu schwarzbraun-orange (Soce 1000) und schwarzbraun (Soce 176).

Mehrere Stämme zeigten, je nach Medium und damit verbundener Nahrungsquelle, eine abweichende Produktion von dunklen Pigmenten. Die Abbildung 21 zeigt exemplarisch das Wachstum des Soce 1097 auf P Medium, VY/2 Medium und Stan21 Medium mit der Nahrungsquelle Zellulose. Der Stamm wächst auf VY/2 orange/schwarz, wohingegen auf dem Filterpapier eine einheitlich schwarzbraune Pigmentierung erkennbar ist. Auf P Medium wächst er leuchtend orange.

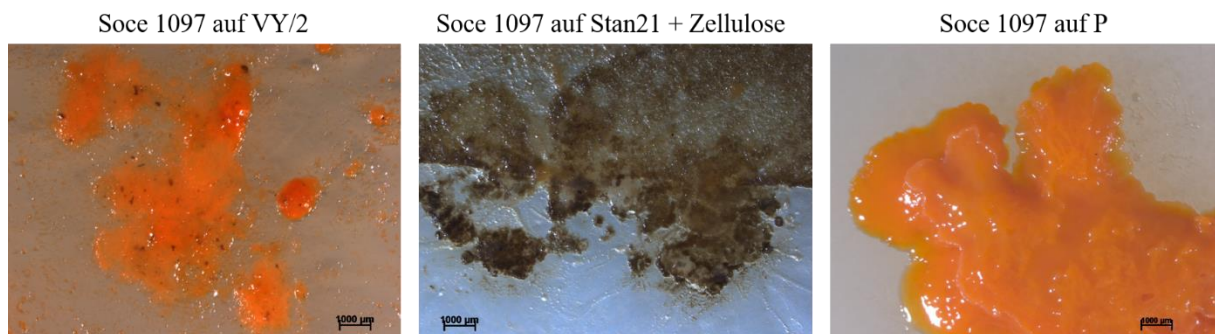


Abbildung 21 Wachstum von Soce 1097 auf unterschiedlichen Medien.

3.2 Genotypische Analysen

3.2.1 16S rRNA-Gensequenzvergleich und phylogenetischer Stammbaum

Wie in Abschnitt 2.2.9.1 beschrieben, wurde das 16S rRNA-Gen mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese identifiziert (s. Abb. 22).

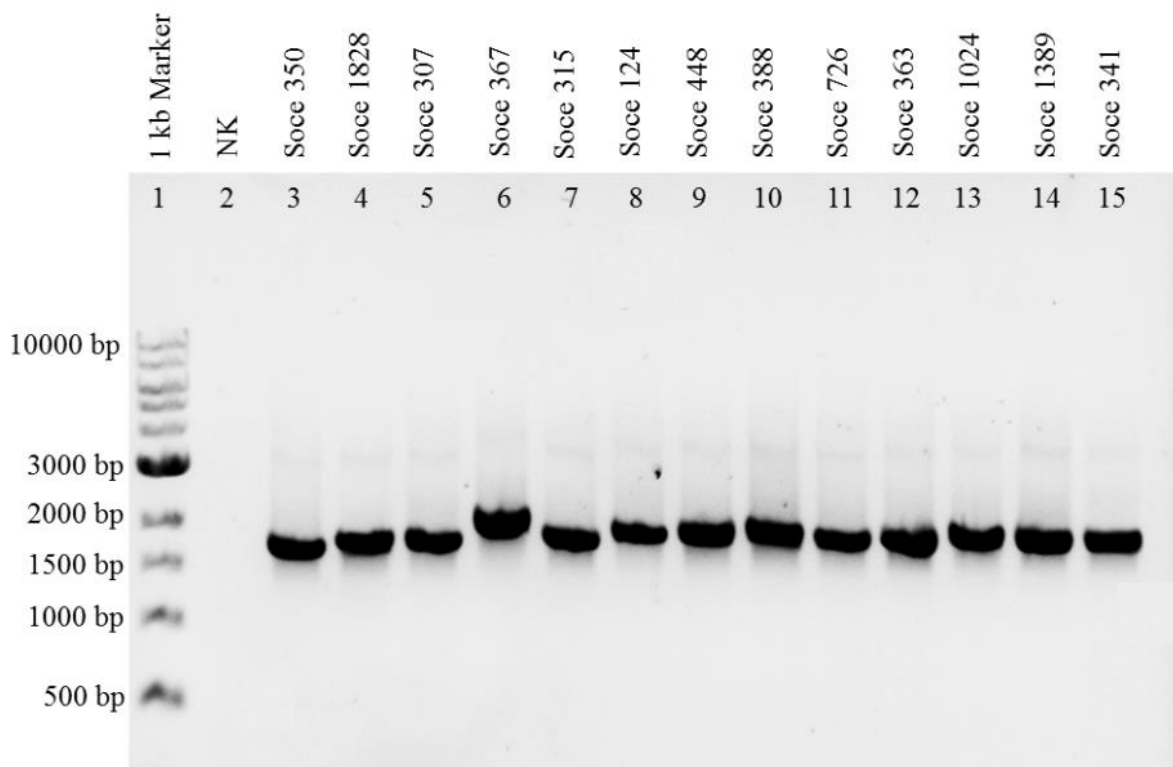


Abbildung 22 Agarosegel mit dem PCR-Produkt 16S rRNA-Gen. Auf Spur 1 befindet sich der Größenmarker. Auf Spur zwei wurde die Negativkontrolle aufgetragen (PCR wurde frei von genomischer DNA durchgeführt). Die PCR-Produkte von 13 der 73 untersuchten Stämme befinden sich auf den Spuren 3-15. Zur Sichtbarmachung der Banden, auf der Höhe von 1500 bp, wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und komplett auf ein Agarosegel aufgetragen. Das PCR-Produkt wurde über UV-Licht ausgeschnitten und anschließend sequenziert.

Die erhaltenen Gensequenzen wurden mit dem Programm Sequencher 5.4 assembliert. Nach dem Alignment der Sequenzen mit dem Programm MEGA6 wurde anschließend ein phylogenetischer Baum (maximum-likelihood) errechnet (s. Abb. 23).

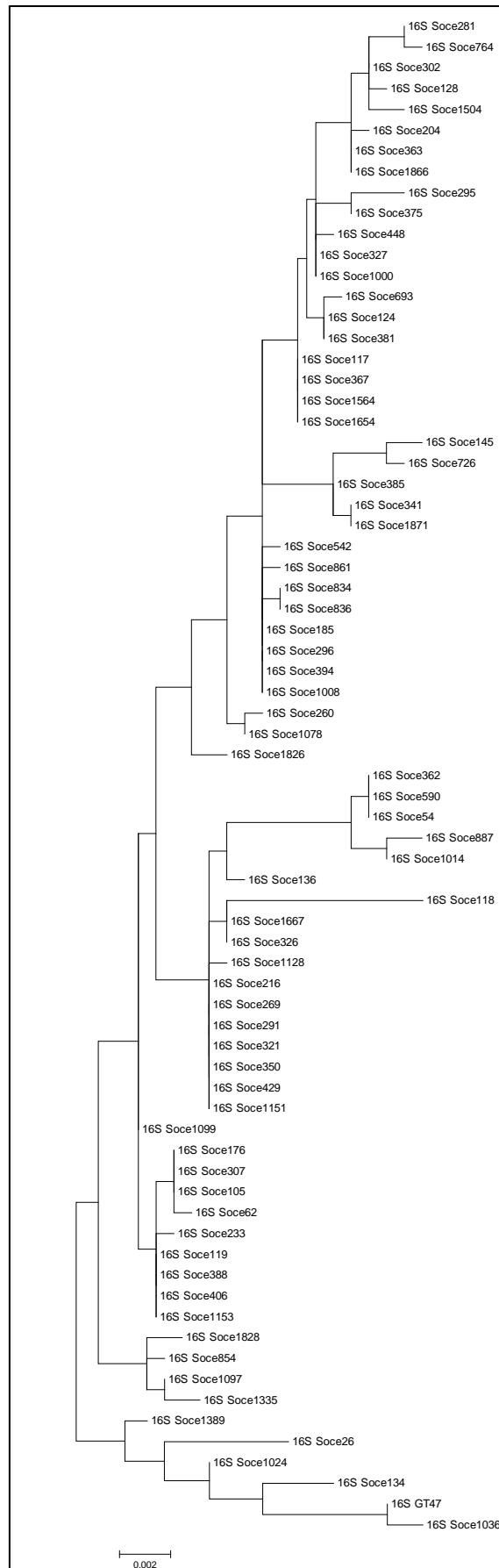


Abbildung 23 Phylogenetischer Baum (maximum-likelihood) auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen.

Anhand der Abzweigungen des phylogenetischen Baumes wird deutlich, dass viele Isolate eine sehr geringe genetische Distanz des 16S rRNA-Gens aufweisen.

3.2.2 Analyse der *xynB1*-Gensequenzen und phylogenetischer Stammbaum

Das *xynB1*-Gen codiert für eine *Sorangium*-spezifische Zellulase. Innerhalb der Gattung ist es hochkonserviert und diente somit als taxonomischer Marker für die Analyse des Verwandtschaftsgrades der Untersuchten *Sorangium*-Stämme untereinander. Der 525 bp lange Sequenzabschnitt des Zellulasegens wurde mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Anschließend wurde mit dem Programm Sequencher 5.4 die Assemblierung der Sequenzen durchgeführt. Der phylogenetische Baum (maximum-likelihood) wurde mit der Software MEGA 6.0 erstellt (s. Abb. 24).

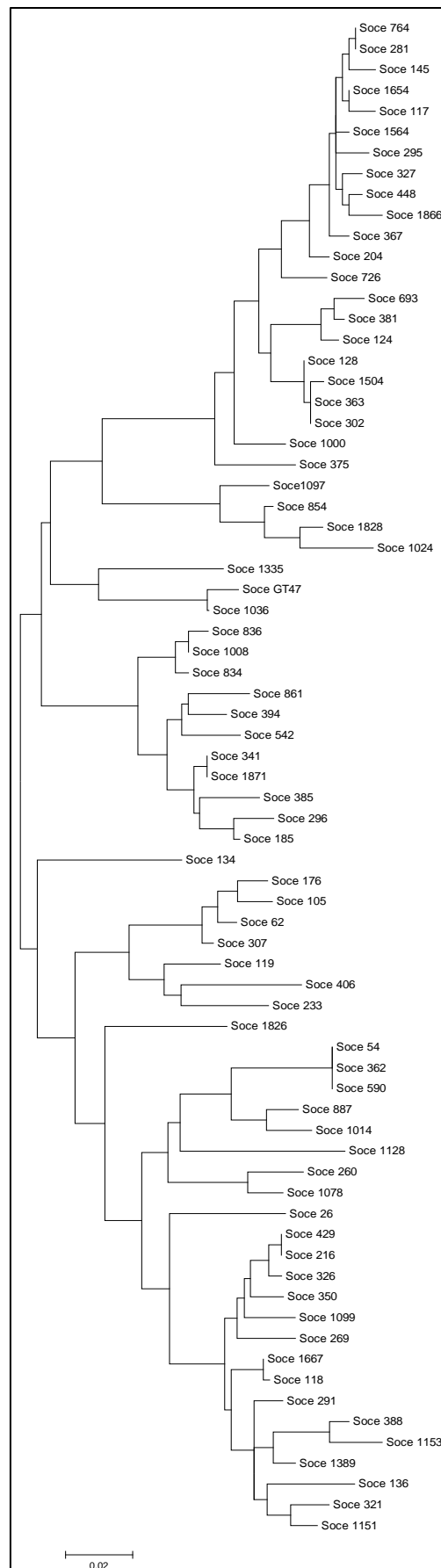


Abbildung 24 Maximum-likelihood Baum auf Basis der *xynBI*-Gensequenzen der 73 untersuchten Stämme der Gattung *Sorangium*.

3.2.2.1 Definition phylogenetischer Kladen und putativer Typstämme

Die Abbildung 25 zeigt den phylogentischen Baum auf der Basis der *xynB1*-Gensequenz und eine farbliche Einteilung der 15 manuell definierten Kladen (A-O). Aufgrund der hohen Auflösung der genetischen Distanz diente dieser Stammbaum im Verlauf dieser Arbeit als Basis für die Klassifizierung und Beschreibung der neuen Spezies der Gattung *Sorangium*.

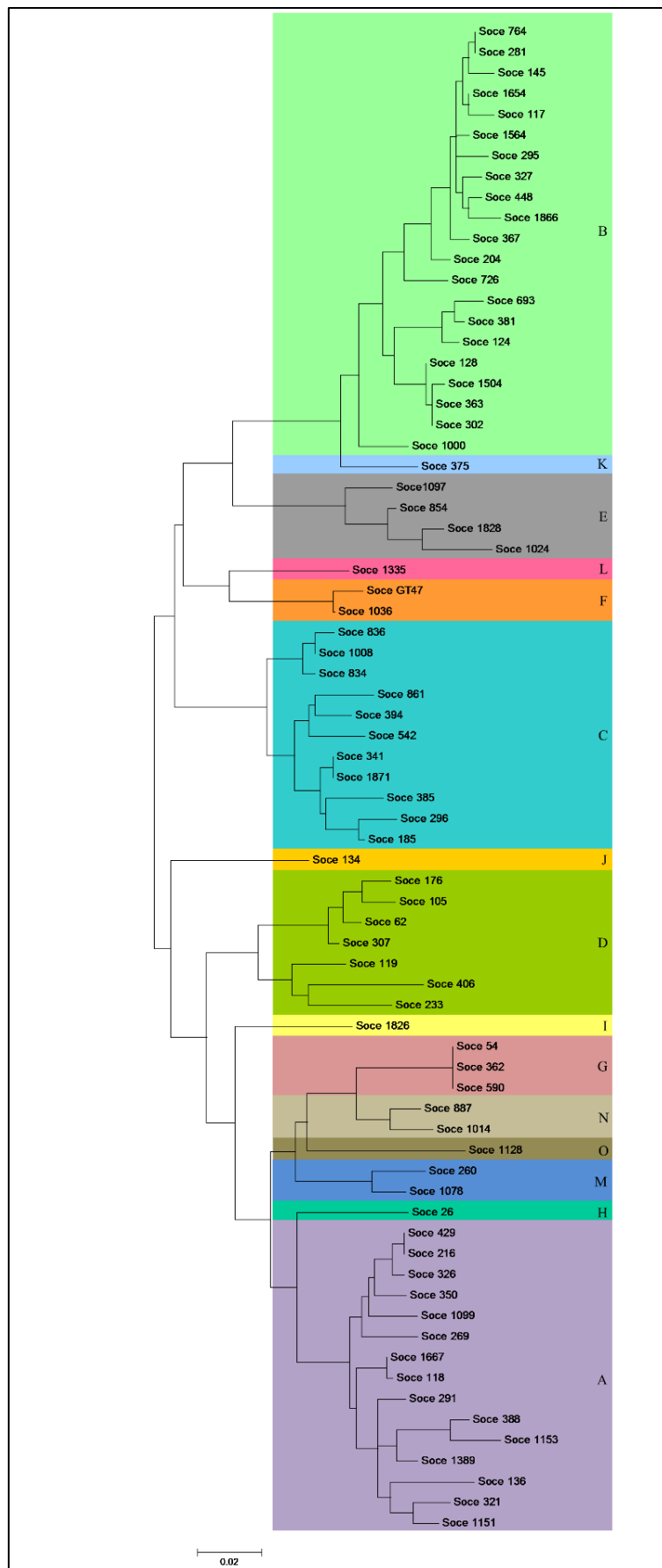


Abbildung 25 Maximum-likelihood Baum auf Basis der *xynB1*-Gensequenzen der 73 untersuchten Stämme der Gattung *Sorangium*. Farbliche Unterteilung der 15 Kladen (A-O).

Die Einteilung der Kladen fand in Anlehnung an die Forschungsergebnisse von Lee *et al.* (2011) statt, welche insgesamt 5 Kladen (A-E) definierten. Als Basis für die Einteilung der Kladen dienten die Abzweigungsdistanzen der Äste. Aus jeder Klade wurde ein Stamm, der Haupteigenschaften der Vertreter seiner Klade und ein gutes Wachstumsverhalten zeigte, als putativer Typstamm bestimmt (s. Tab 13).

Tabelle 13 Zuordnung der Typstämme zu den Kladen A-O

Klade	putativer Typstamm
A	Soce 321
B	Soce 1000
C	Soce 1871
D	Soce 176
E	Soce 1828
F	Soce GT47
G	Soce 362
H	Soce 26
I	Soce 1828
J	Soce 134
K	Soce 375
L	Soce 1335
M	Soce 1078
N	Soce 1014
O	Soce 1128

3.2.2.2 Übertragung der nach *xynB1* definierten Kladen auf den phylogenetischen Stammbaum auf Basis des 16S rRNA-Gens

Die Abbildung 26 zeigt den phylogenetischen Baum und eine farbliche Unterteilung der Stämme in die 15 unterschiedlichen Kladen. Die manuelle Unterteilung basiert auf den Grad der verwandtschaftlichen Distanz und wurde nach der Fertigstellung aller phylogenetischen Bäume innerhalb dieser Arbeit vorgenommen. Aufgrund der großen Similarität der 16S rRNA-Gensequenzen befinden sich viele Gruppierungen innerhalb des Baumes auf einer Ebene. Die Farbliche Unterteilung und Übertragung der nach *xynB1* definierten Kladen zeigt, dass viele Kladengruppierungen der beiden Bäume übereinstimmen. Allerdings befindet sich der einzige Vertreter der Klade K, Soce 375, innerhalb der Klade B im Stammbaum auf Basis des 16S rRNA-Gens. Die Klade A ist von der Klade D ebenfalls durchbrochen. Auch die Vertreter der Kladen L und H, Soce 1335 und Soce 26, liegen in der phylogenetischen Einteilung innerhalb der Klade E.

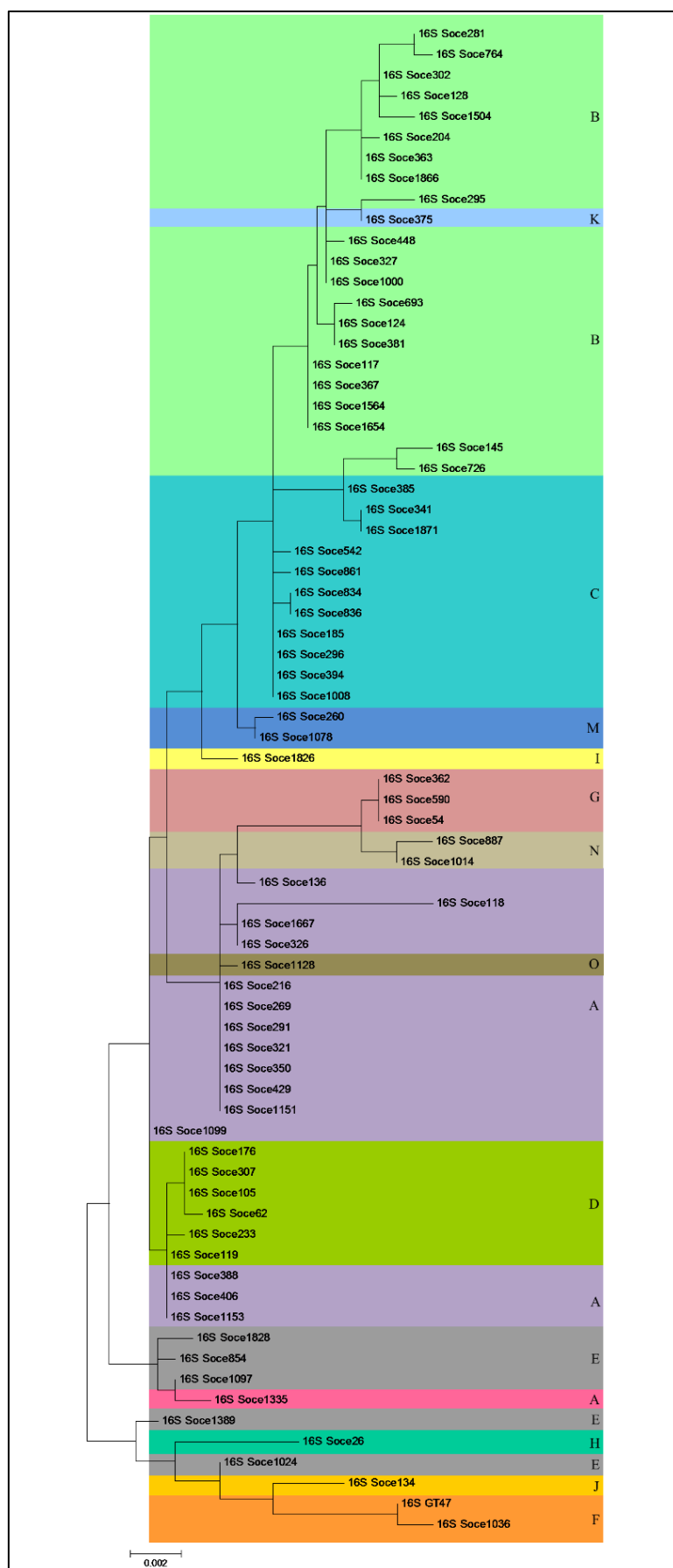


Abbildung 26 Phylogenetischer Baum (maximum-likelihood) auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen. Die farbliche Unterteilung der Stämme basiert auf den festgelegten Kladen auf Basis des *xynBI*-Baumes.

3.2.2.3 Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen der putativen Typstämme untereinander

Die Sequenzen der 16S rRNA-Gens der definierten, putativen 15 Typstämme wurden miteinander verglichen. Der maximale Unterschied auf Basenebene beträgt 1,4 %, der geringste 0,1 % (s. Tab. 14). Die größten Unterschiede sind grün markiert, die geringsten rot.

Tabelle 14 Prozentuale Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen der putativen Typstämme untereinander.

Stamm	GT47	26	134	176	321	362	375	1000	1014	1078	1128	1335	1826	1828	1871
GT47	100	99,3	99,5	99,1	99,1	98,7	99,4	99,4	98,6	99,4	99,1	99,1	99,3	99,4	99,1
26	99,3	100	99,0	99,0	98,7	98,6	98,7	98,7	98,6	98,8	98,6	99,1	98,8	99,0	99,3
134	99,5	99,0	100	99,0	99,0	98,8	99,1	99,1	98,6	99,3	98,9	98,8	99,2	98,9	99,5
176	99,1	99,0	99,0	100	99,5	99,2	99,3	99,3	99,1	99,4	99,5	99,3	99,5	99,3	99,1
321	99,1	98,7	99,0	99,5	100	99,3	99,3	99,3	99,2	99,4	99,9	99,3	99,5	99,2	99,1
362	98,7	98,6	98,8	99,2	99,3	100	98,8	99,0	99,7	99,3	99,2	98,8	98,9	98,9	98,7
375	99,4	98,7	99,1	99,3	99,3	98,8	100	99,8	98,8	99,5	99,2	99,1	99,5	99,1	99,4
1000	99,4	98,7	99,1	99,3	99,3	99,0	99,8	100	98,9	99,7	99,2	99,1	99,5	99,1	99,4
1014	98,6	98,6	98,6	99,1	99,2	99,7	98,8	98,9	100	99,2	99,1	98,8	98,8	98,7	98,6
1078	99,4	98,8	99,3	99,4	99,4	99,3	99,5	99,7	99,2	100	99,3	99,3	99,6	99,2	99,4
1128	99,1	98,6	98,9	99,5	99,9	99,2	99,2	99,2	99,1	99,3	100	99,3	99,4	99,1	99,1
1335	99,1	99,1	98,8	99,3	99,3	98,8	99,1	99,1	98,8	99,3	99,3	100	99,3	99,7	99,1
1826	99,3	98,8	99,2	99,5	99,5	98,9	99,5	99,5	98,8	99,6	99,4	99,3	100	99,3	99,3
1828	99,4	99,0	98,9	99,3	99,2	98,9	99,1	99,1	98,7	99,2	99,1	99,7	99,3	100	99,1
1871	99,1	99,3	99,5	99,1	99,1	98,7	99,4	99,4	98,6	99,4	99,1	99,1	99,3	99,1	100

Die höchste genetische Ähnlichkeit untereinander zeigen die Stämme 1128 und 321 mit 99,9 % Sequenzübereinstimmung. Dies ist auch an der Lage im phylogenetischen Stammbaum der 16S rRNA-Gensequenzen erkennbar. Der Stamm 1128 ist der einzige Vertreter der Klade O und liegt innerhalb der Klade A, deren Typstamm der Stamm 321 ist. Im phylogenetischen

Stammbaum auf Basis des Zellulasegens *xynBI* sind die beiden Stämme jedoch deutlich voneinander separiert.

3.2.3 Analyse der *groEL1* Gensequenzen und phylogenetischer Stammbaum

Das *groEL1* Gen codiert für ein Chaperon und ist hochkonserviert. Aus diesem Grund wurde es als zusätzlicher Marker für die Taxonomie der Gattung *Sorangium* verwendet. Die Abbildung 27 zeigt den phylogenetischen Stammbaum.

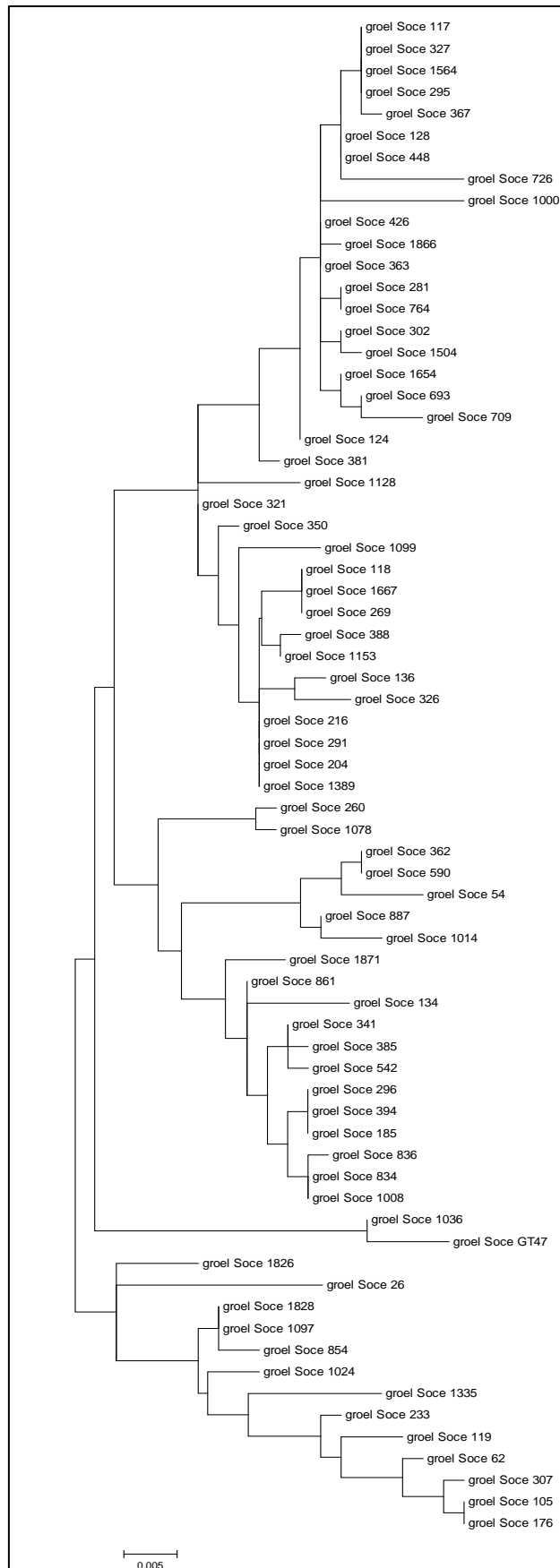


Abbildung 27 Phylogenetischer Baum (maximum-likelihood) auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzen.

3.2.3.1 Übertragung der nach *xynBI* definierten Kladen auf den phylogenetischen Stammbaum auf Basis von *groEL*

Die Aufteilung der Kladen deckt sich weitestgehend mit der Kladenunterteilung auf der Basis von *xynBI* (s. Abb. 28). Der Stamm 134 der Klade J befindet sich im *groEL*-Stammbaum innerhalb der Klade C. Die übrigen Kladen sind, ähnlich wie bei dem *xynBI*-Stammbaum, aufgrund der Verzweigungsäste gut voneinander unterscheidbar.

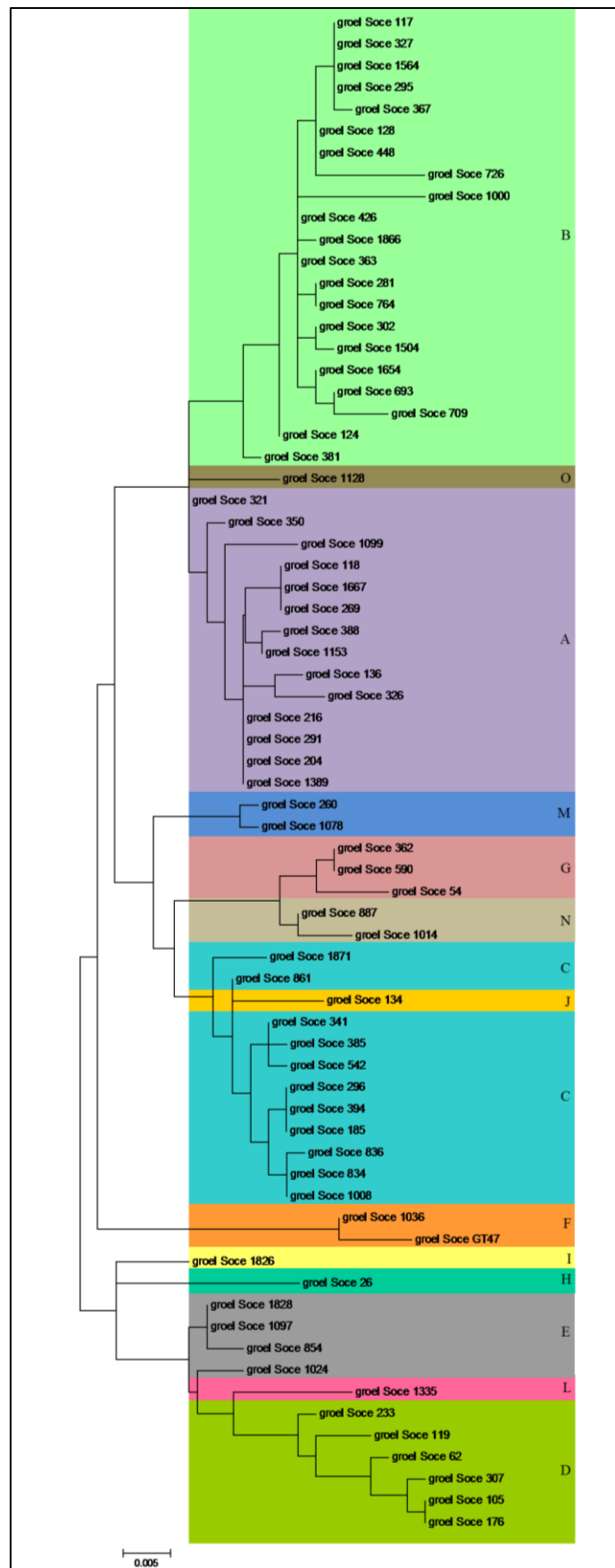


Abbildung 28 Maximum-Likelihood Baum der 73 *Sorangium* Stämme auf Basis der *groEL1*-Sequenzen. Die Unterteilung der Kladen basiert auf dem *xynB1*-Gen.

3.2.4 Morphologisches Erscheinungsbild innerhalb der definierten Klade

Die Vertreter der unterschiedlichen Klade wurden hinsichtlich ihrer Koloniefärbung untersucht. Dazu wurden die Stämme auf VY/2 Nährmedium ausplattiert und, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, für fünf Wochen inkubiert. Die Tabelle zeigt, dass innerhalb der Klade A, B, C und D keine einheitliche Koloniefärbung auftritt. Die Kolonien sind braun/schwarz (s), orange (o) oder braun/schwarz-orange (s/o) (s. Tab. 15).

Tabelle 15 Koloniefärbung der untersuchten Stämme von *S. cellulorum*.

Klade	Stamm	Farbe
A	118	s/o
	136	s
	204	o
	216	o
	269	o
	291	s/o
	321	o
	326	o
	350	o
	388	o
	429	o
	1099	o
	1151	o
	1153	o
	1389	o
	1667	s/o
B	117	o
	124	s/o
	128	o
	145	o
	204	o
	281	o
	295	s/o
	302	s/o
	327	s
	363	s
	367	s/o
	381	s/o
	426	s/o
	448	s/o
	693	s
	726	o
	764	s/o
	1000	s/o
	1504	o
	1564	o
	1654	s/o
	1866	s

Klade	Stamm	Farbe
C	185	s
	296	o
	341	s
	542	s/o
	385	o
	394	o
	834	o
	836	o
	861	o
	1008	o
	1871	o
D	62	o
	105	s/o
	119	o
	176	o
	233	o
	307	o
E	406	o
	854	o
	1024	o
	1097	o
F	1828	o
	GT47	o
G	1036	o
	54	o
	362	o
H	590	o
	26	o
I	1826	o
J	134	o
K	375	o
L	1335	o
M	260	o
	1078	o
N	887	o
	1014	o
O	1128	o

3.3 APIZYM® Enzymaktivitätstest

Bei der Untersuchung der 73 Isolate von *S. cellulorum* hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität wurde für jedes Isolat ein APIZYM® Teststreifen, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, beimpft und inkubiert. Die Auswertung erfolgte visuell über den Vergleich der Farbinintensität der einzelnen Mikroküvetten mit Hilfe einer Farbtabelle. Die Teststreifen zeigten, bis auf die Enzymreaktion Nr. 18, ein einheitliches Bild. Die Isolate können demnach in zwei Gruppen unterteilt werden, von denen nur eine Gruppe die Aktivität der N-acetyl- β -Glukosaminidase aufweist (s. Abb. 29 u. Tab. 16).



Abbildung 29 APIZYM® Teststreifen des neu definierten Typstamms GT47 ohne Aktivität der N-acetyl- β -Glukosaminidase (A) im Vergleich mit dem neu definierten Typstamm 1826 mit N-acetyl- β -Glukosaminidase Aktivität (B). Die Suspension in der Mikroküvette Nr. 18 in mit der Zellsuspension des Stammes Soce 1826 verfärbt sich dunkelbraun, wohingegen die Mikroküvette Nr. 18 mit dem Stamm Soce 1826 farblos bleibt.

Tabelle 16 Stämme mit und ohne N-acetyl- β -Glukosaminidase Aktivität

Stämme mit N-acetyl- β -Glukosaminidase Aktivität	Stämme ohne N-acetyl- β -Glukosaminidase Aktivität
26	GT47
62	54
105	117
118	124
119	128
135	145
136	204
176	281
185	295
216	302
233	327
260	362
269	363
291	367
296	375
307	381
321	426
327	448
341	590
385	693
388	726
394	764
406	1000
542	1036
834	1504
836	1564
854	1654
861	1866
887	
1008	
1014	
1024	
1078	
1097	
1099	
1128	
1153	
1335	
1389	
1667	
1826	
1828	
1871	

3.3.2 N-acetyl- β -Glukosaminidase-Aktivität der definierten Kladen

Legt man die Ergebnisse des Enzymaktivitätstests mit der phylogenetischen Aufteilung der Stämme auf Basis des Zellulasegens *xynBI* übereinander, wird die Einteilung der Kladen unterstützt (s. Abb. 30).

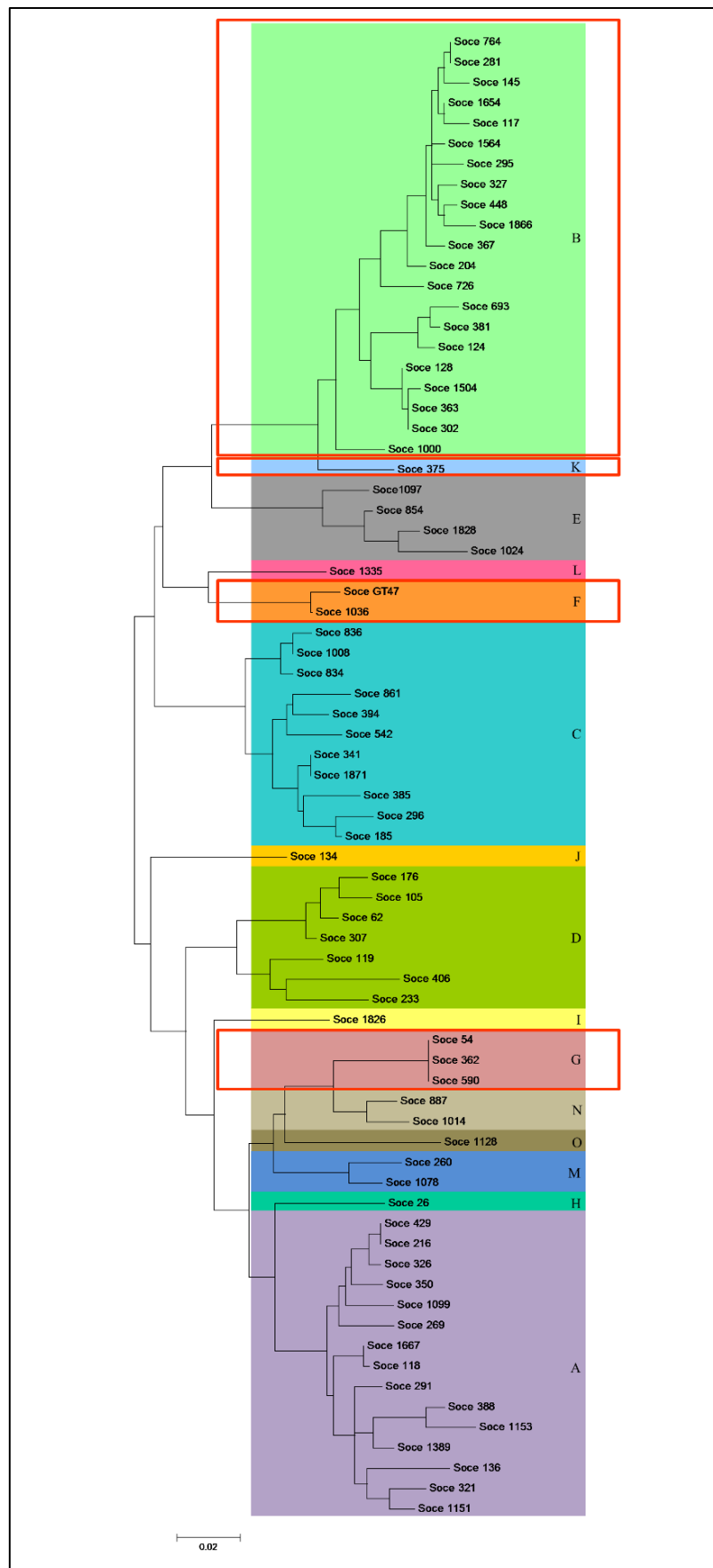


Abbildung 30 Phylogenetischer Baum auf Basis von *xynB1*. Die roten Markierungen zeigen die fehlende Aktivität der N-acetyl-β-Glucosaminidase an.

3.4 MALDI-TOF/MS zur Bestimmung von myxobakteriellen Arten

Die Zellmasse der untersuchten 73 *Sorangium* Stämme wurde, wie in 2.2.4.1 beschrieben, aufbereitet. Anschließend wurde die MALDI-TOF/MS von Fabienne Hennessen am HIPS, in der Abteilung Mikrobielle Naturstoffe, durchgeführt. In dem Dendrogramm ist die Ähnlichkeit der untersuchten Stämme grafisch dargestellt. Das Dendrogramm wurde mit der Software MALDI Biotyper 3.1 der Firma Bruker erstellt. Der Übereinstimmungsgrad der Proteinmuster bestimmt die Positionen der einzelnen Verzweigungen. Aufgrund dieser Verzweigungen wurden die Stämme in vier farblich gekennzeichnete Klade unterteilt. Als Vergleichsgruppe wurde der Stamm *Myxococcus xanthus* 9223 gewählt. Wie in Abbildung 31 erkennbar, ist dieser am entferntesten mit den *Sorangium* Stämmen verwandt.

Das Dendrogramm zeigt eine Aufteilung der untersuchten Isolate in vier, farblich gekennzeichnete, Klade. Die Aufteilung der Klade deckt sich nicht mit den phylogenetischen Stammbäumen auf der Basis von *xynB1*, *groEL1* oder des 16S rRNA-Gens. Allerdings zeigen einige Teilbereiche des Dendrogramms Ähnlichkeiten zu den phylogenetischen Stammbäumen. So bilden die Stämme Soce 54, Soce 590 und Soce 362 ein nah verwandtes Cluster. Auch die sehr nah verwandten Stämme Soce 1871 und Soce 341 liegen im Dendrogramm direkt nebeneinander mit einem niedrigen Verzweigungspunkt der Äste. Dies gilt auch für die Stämme GT47 und Soce 1036, welche nach der phylogenetischen Einteilung auf Basis des *xynB1*-Gens ein eigenständiges Taxon bilden.

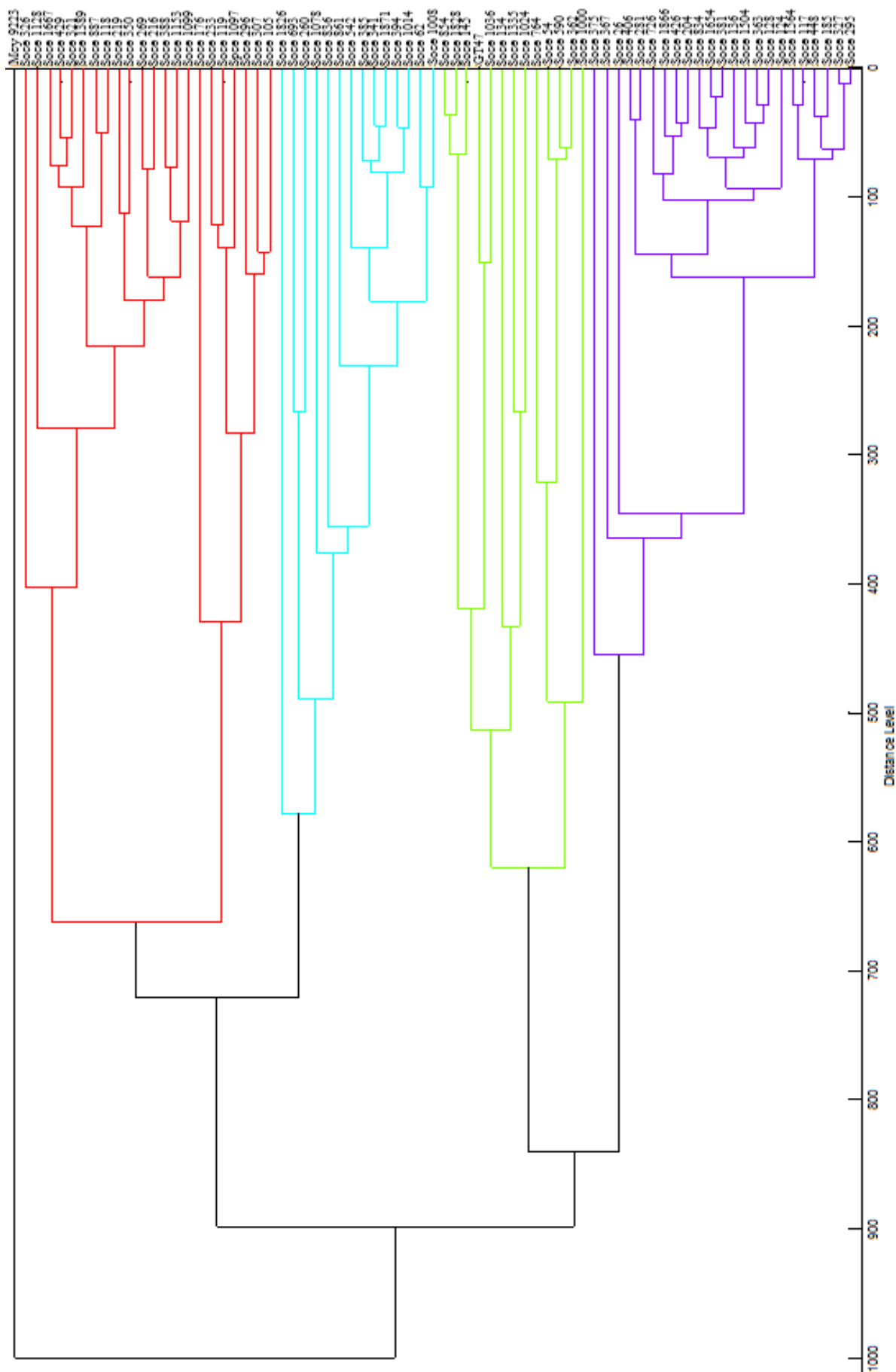


Abbildung 31 MALDI-TOF Dendrogramm der 73 untersuchten Stämme der Gattung *Sorangium*.

3.5 DNA-DNA-Hybridisierung als Basis der polyphasischen Taxonomie

Die DDH ist eine Methode zur Bestimmung der Artenzugehörigkeit eines Organismus. Diese basiert auf der Sequenzähnlichkeit der doppelsträngigen, genomischen DNA gegenüber der DNA zum nächsten verwandten Typstamm. Um diese zu ermitteln, wird die Referenz-DNA sowie die zu untersuchende DNA auf 70 °C erhitzt, um eine Denaturierung der Doppelhelices zu bewirken. Die komplementären DNA-Stränge beider Spezies lagern sich während des Abkühlens wieder zusammen und bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus. Nach dieser Hybridisierung wird die DNA erneut erhitzt. Der spezifische Schmelzpunkt, bei dem die hybridisierte DNA erneut denaturiert, gibt Auskunft über die Sequenzhomologie der untersuchten Spezies. Je ähnlicher die Sequenzen, desto mehr Bindungen wurden gebildet und desto mehr Energie wird für die Denaturierung der Doppelstränge benötigt.

Die DDH für diese Arbeit wurden von Prof. Dr. Peter Kämpfer am Institut für angewandte Mikrobiologie an der Justus-Liebig Universität nach dem Protokoll von Ziemke *et al.* (1998) und Lind und Ursing (1986) durchgeführt. Bei dieser Methode wird nur eine vergleichsweise geringe Menge an DNA benötigt. Zur Detektion der Hybridisierungsrate wird ein Digoxigenin-Marker anstelle von radioaktiven Markern verwendet. Die Hybridisierungsexperimente wurden für jeden Stamm wiederholt.

Die Abbildung 32 zeigt die Mittelwerte der Hybridisierung der untersuchten Typstämme zu dem valide beschriebenen Typstamm 1871 in Prozent. In Tabelle 17 sind die Werte der beiden Hybridisierungswerte für jeden Stamm aufgelistet. Bis auf die Stämme Soce 1014 (76 %), Soce 1078 (82,8 %), Soce 1128 (74,2 %) und Soce 1335 (74,0 %) liegen alle Werte unter der 70 %-Grenze. Die Kongruenz der DNA des Stammes GT47 mit dem Stamm Soce 1871 ist mit 21,7 % besonders gering. Sehr nah an der 70 %-Grenze befindet sich der Stamm Soce 362 (63,9 %). Des Weiteren lag der GC-Gehalt der untersuchten Stämme bei 68-70 %.

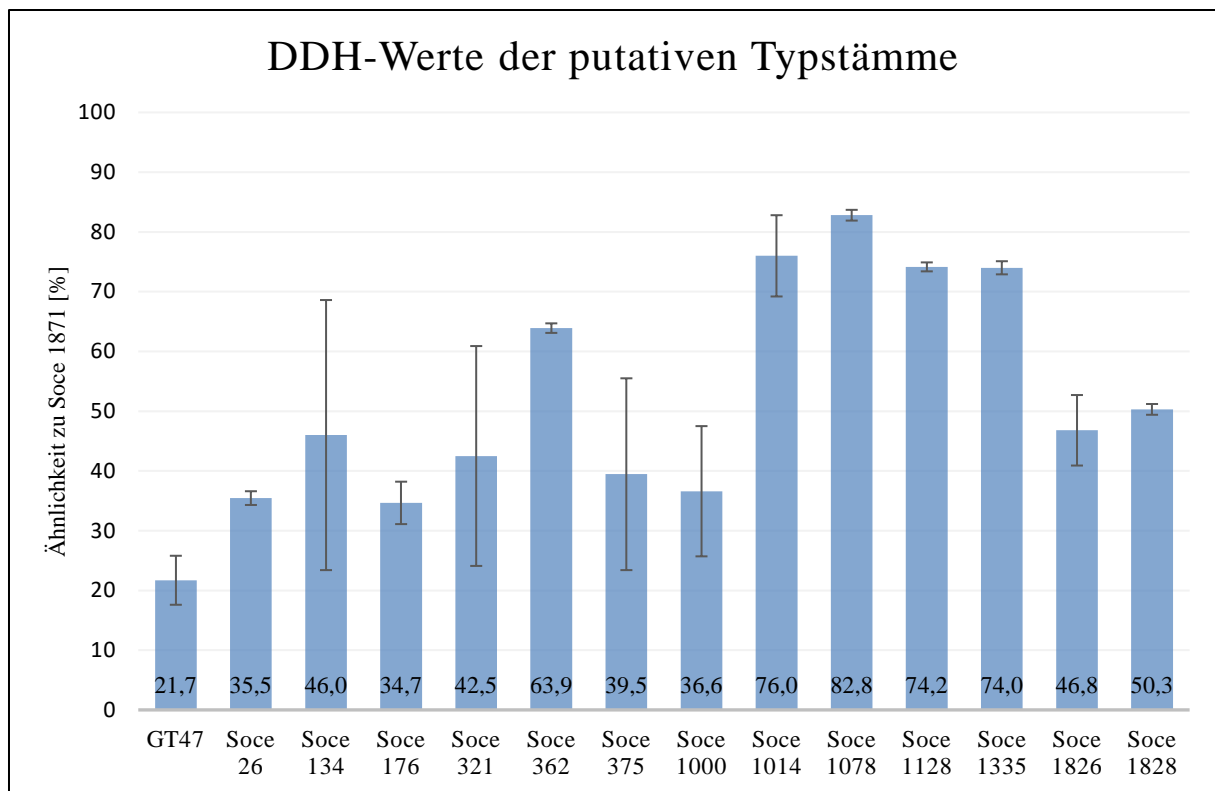


Abbildung 32 Mittelwerte der Hybridisierung mit Soce 1871 der putativen Typstämme in Prozent.

Tabelle 17 DDH-Werte der putativen Typstämme mit dem Stamm Soce 1871.

Stamm	DDH-Wert 1 [%]	DDH-Wert 2 [%]
GT47	17,6	25,8
Soce 26	36,6	34,3
Soce 134	68,6	23,4
Soce 176	38,2	24,1
Soce 321	24,1	60,9
Soce 362	64,7	63,1
Soce 375	55,5	23,4
Soce 1000	47,5	25,7
Soce 1014	82,8	69,2
Soce 1078	83,7	81,9
Soce 1128	74,9	73,4
Soce 1335	75,1	72,9
Soce 1826	40,9	52,7
Soce 1828	51,2	49,4

3.6 Biologisch aktive Substanzen der Typstämme

3.6.1 Ergebnisse des Serienverdünnungstests

Die Rohextrakte der 15 ausgewählten, putativen Typstämme wurden mittels MIC, wie in Abschnitt 2.2.3. beschrieben, auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht. Die Tabelle 18 zeigt die Hemmintensität der jeweiligen Rohextrakte auf die jeweiligen Testorganismen. Hierbei gibt der jeweilige Buchstabe die entsprechende Verdünnung an, bei der noch ein hemmender Effekt sichtbar war (s. Abb. 29). Die Auswertung erfolgte visuell, nachdem festgestellt wurde, ob in der Methanol-Negativkontrolle ein Wachstum des jeweiligen Testpathogens stattgefunden hat. Bei *C. violaceum* und *P. aeruginosa* PA14 wurde zusätzlich noch eine mögliche Farbstoffhemmung kontrolliert.

Tabelle 18 Hemmintensität der Typstämme gegenüber den Testorganismen

	Probe	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> TolC	<i>C. violaceum</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>St. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. mageritensis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i>
				WH	FH	WH	FH							
1	GT47	b	c	/	/	/	/	/	b	/	h	/	c	b
2	26	/	c	/	/	/	/	/	/	a	h	/	h	a
3	134	/	d	f	f	/	/	/	/	b	h	/	a	d
4	176	/	a	a	/	/	/	/	/	/	a	/	a	a
5	321	/	b	h	h	g	g	b	/	b	/	/	a	d
6	362	/	a	a	a	/	/	h	h	a	/	/	c	h
7	375	/	a	b	b	/	/	f	/	a	/	/	a	e
8	1000	/	b	a	a	/	/	b	g	d	/	/	a	c
9	1826	c	f	c	c	a	a	h	h	e	b	a	h	h
10	1828	/	a	/	/	/	/	c	/	/	/	/	/	/
11	1871	/	c	/	/	/	/	b	/	a	a	/	a	b
12	1014	/	b	b	b	/	/	/	a	/	a	/	c	c
13	1078	/	a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
14	1128	/	c	d	e	h	h	h	h	c	/	c	b	h
15	1335	/	a	/	/	/	/	/	/	/	/	e	a	a
16	MeOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Rohextrakte zeigten für jeden Stamm individuelle Hemmungen in Bezug auf die getesteten Organismen. Hierbei inhibierte der Extrakt des Stammes Soce 1826 das Wachstum aller Testorganismen, wohingegen bei dem Stamm Soce 1078 lediglich eine geringe Hemmaktivität gegen den *E. coli* TolC Stamm nachgewiesen werden konnte. Die Stämme Soce 1335 und Soce 1828 zeigten ebenfalls insgesamt nur eine geringe antimikrobielle Aktivität. Die Abbildung 33 zeigt exemplarisch die Mikrotiterplatten 1 und 2 mit dem Testorganismus *C. violaceum* nach der Wachstumshemmung mit anschließender Farbstoffhemmung.

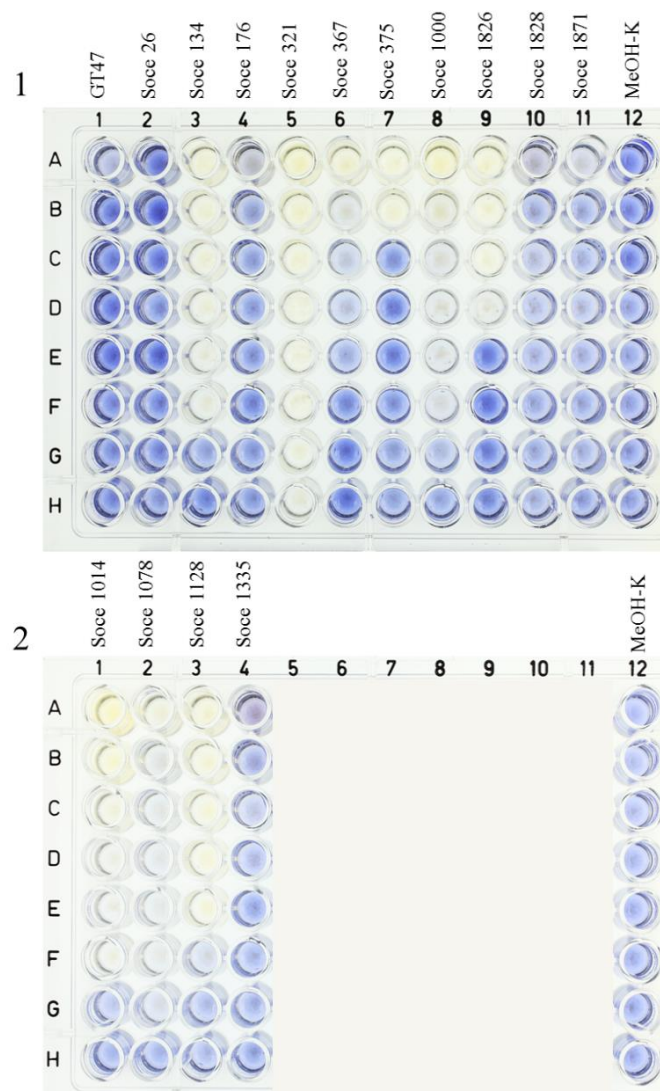


Abbildung 33 Serienverdünnungstest der 15 putativen Typstämme am Beispiel von *C. violaceum* nach der Wachstums- und Farbstoffhemmung. Dargestellt sind Mikrotiterplatte 1 (oben) und Mikrotiterplatte 2 (unten). In den Vertiefungen, in denen keine Violettfärbung erkennbar ist, fand eine Hemmung des Wachstums durch den jeweiligen Rohextrakt statt. An Position 12 befindet sich auf beiden Platten die Methanol-Negativkontrolle. Die visuelle Auswertung der einzelnen Reihen ist in Tabelle 12 dargestellt.

3.6.2 Detektion der Sekundärmetaboliten der putativen Typstämme mittels HRESIMS

Die Bestimmung der Molekularmassen der Sekundärmetabolite fand, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, mittels HRESIMS am MaXis Massenspektrometer statt. Die Abbildung 34 zeigt die Retentionszeiten der im Rohextrakt des Stammes Soce 1871 enthaltenen Moleküle innerhalb eines Hauptpeakchromatogramms, sowie das UV-Chromatogramm des Extraktes.

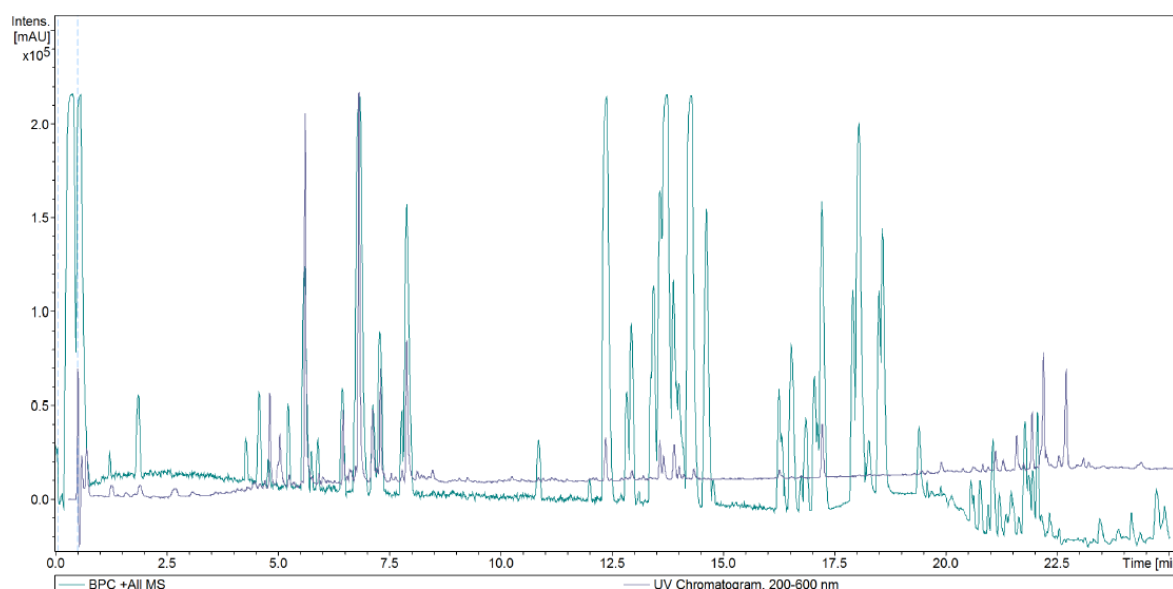


Abbildung 34 Hauptchromatogramm und UV-Chromatogramm des Rohextraktes des Stammes Soce 1871.

Die Chromatogramme der Typstämme wurden mit Hilfe der SmartFormula® Software ausgewertet. Die erhaltenen molekularen Massen der Moleküle wurden mit den vorhandenen Molekülmassen in den Datenbanken verglichen, sodass die bekannten Sekundärmetabolite bestimmt werden konnten. Die detektierten, biologisch aktiven Sekundärmetabolite der Typstämme sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Stämme zeigen untereinander ein heterogenes und individuelles Muster bezüglich der produzierten Sekundärmetabolite. Den Chromatogrammen der Rohextrakte der Stämme Soce 1828 und Soce 1335 konnten keine bekannten Sekundärmetabolite zugeordnet werden.

Tabelle 19 Sekundärmetaboliten der Typstämme

Stamm	Sulfangolid	Soraphene	Neosoraphen	Ratjadon	Jerangolid	Pellasuren	Etnangien	Sulasoren	Ambruticin	Cruentaren	Icumazole	Maracen	Tartrolon	Disorazol	Sorazolon	Sorangiosid	Cerebrosid	Thuggacin	Lipothiazol	Myxalamid	Chlorotonil
26	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
134	-	-	-	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
176	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
321	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-
1828	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1871	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-
GT47	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-
1014	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1078	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
1128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	-	-	x
1335	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.7 Fettsäureanalyse

Ein Vergleich der Lipidzusammensetzung der Zellmembranen von Bakterienisolaten gibt Aufschluss über den Grad der Verwandtschaft zweier Isolate. Vertreter einer Art weisen häufig ein spezifisches Muster an charakteristischen Fettsäuren auf, die sich in ihrer Quantität ähneln. Nachdem die Zellmasse gefriergetrocknet wurde, wurden die Fettsäuren, wie in Abschnitt 2.2.6, beschrieben aus den Bakterienmembranen extrahiert, zu Methylestern derivatisiert und mittels Gaschromatographie detektiert. Tabelle 20 zeigt eine Übersicht der produzierten Fettsäuren der putativen Typstämme. Die jeweiligen Hauptfettsäuren der Stämme sind markiert. Die Sorangien enthalten vor allem C16:0, 2-Hydroxyfettsäuren und iso-verzweigte Fettsäuren.

Tabelle 20 Fettsäureprofile der definierten Typstämme. Angaben in Prozen.

Kurzkettige Fettsäuren	1871	GT 47	26	134	176	321	362	375	1000	1014	1078	1128	1335	1826	1828	B. cr.
12:0	-	-	0,04	0,01	0,04	0,02	-	0,01	0,02	0,01	0,04	0,03	0,06	-	0,03	-
14:0	0,21	0,03	0,71	0,65	0,80	0,93	0,25	0,61	0,52	0,23	0,84	0,84	0,41	0,07	0,58	1,8
15:0	-	-	0,01	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	1,4
16:0	11,95	1,99	12,96	15,93	20,05	12,73	13,87	20,10	9,85	7,22	18,44	15,63	11,64	6,43	12,10	5
17:0	0,51	-	-	0,09	0,09	0,08	0,16	0,05	0,16	0,07	0,32	-	0,18	-	0,24	1,6
18:0	9,95	5,05	2,94	8,94	4,51	3,91	6,68	5,02	4,49	7,03	7,10	4,44	9,76	5,11	9,66	2
19:0	0,10	-	-	-	-	0,03	0,04	-	0,09	0,07	-	0,04	0,02	-	0,04	-
Einfach ungesättigte Fettsäuren																
14:1w5cis	-	-	0,08	-	0,02	0,08	-	-	0,06	0,01	0,01	-	-	-	0,06	1,0
16:1w7cis	0,01	-	-	0,04	-	-	-	0,04	0,13	-	0,05	-	--	0,02	-	17,5
16:1_isomer2	0,01	-	-	0,02	-	-	0,02	-	0,10	0,01	0,03	-	0,04	0,01	0,04	-
16:1_isomer3	6,04	7,41	13,59	1,66	4,50	9,08	6,20	5,48	6,28	5,06	5,06	3,76	4,87	2,78	7,45	-
18:2w6,9_all_cis	16,91	11,53	0,44	25,53	6,83	8,60	14,41	15,61	12,45	14,09	12,53	1,75	9,40	11,10	10,69	-
18:1_isomer_2	-	-	0,04	0,25	0,12	0,21	0,20	0,20	0,24	0,06	-	0,08	-	-	-	-
18:1w9cis	0,35	-	0,41	0,65	-	0,04	0,06	0,69	0,59	0,03	0,43	-	-	0,38	0,03	13,9
18:1_isomer_3	0,45	-		0,57	-	0,11	0,23	0,49	0,33	0,08	0,43	-	0,11	-	0,10	-
16:1	-	-	0,06	-	-	0,03	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren																
16:2w6,9_all_cis	0,22	-	-	0,24	0,06	0,10	0,18	0,12	0,26	0,32	-	-	0,18	0,03	0,27	-
18:2	0,09	0,04	-	0,12	-	-	0,06	0,08	-	-	0,03	-	-	-	-	-
20:4w6,9,12,15_a ll_cis	-	-	2,42	-	-	0,09	-	-	-	-	-	0,09	-	-	-	-
20:5w3,6,9,12,15 _all_cis	-	-	-	-	-	3,29	-	-	-	-	-	5,29	-	-	-	-
Hydroxyfettsäuren																
18:1_2OH	0,43	1,38	0,35	0,42	0,35	0,61	0,61	0,40	0,32	0,55	0,84	0,52	2,61	0,97	1,27	-

22:0_2OH	-	-	-	0,02	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23:0_2OH	-	-	-	-	-	0,01	0,01	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
24:0_2OH	0,01	0,02	0,03	0,05	0,03	0,07	0,05	0,03	0,03	0,06	0,01	0,05	0,02	0,01	0,01	-
25:0_2OH	-	-	-	-	0,01	0,01	0,01	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-
iso16:0_2OH	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0_2OH	0,29	1,22	0,92	0,21	2,17	2,67	1,65	0,49	0,25	1,15	0,92	1,03	4,72	0,50	2,76	-
iso17:0_2OH	0,41	11,78	5,94	2,98	6,03	6,71	6,11	0,55	1,52	8,73	2,39	2,64	11,80	3,82	9,03	-
17:1_2OH	8,45	9,81	16,75	3,24	12,88	17,55	14,31	10,44	19,10	15,90	9,74	30,43	8,34	34,68	7,44	5,2
Verzweigtkettig e Fettsäuren																
iso13:0	0,07	0,07	0,10	0,21	0,13	0,11	0,07	0,11	0,19	0,04	0,19	0,09	0,13	0,09	0,17	0,3
iso14:0	-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,04	-	0,17	-	-	-	-	0,2
iso15:0	2,82	6,62	4,25	2,83	3,81	3,50	3,50	3,69	4,66	3,88	3,35	3,94	4,79	2,66	7,03	11,1
anteiso15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	0,06	-	-	-	-	-
iso16:0	0,91	0,43	0,17	0,02	0,28	0,20	0,08	0,13	0,34	0,15	2,02	-	0,18	0,13	0,26	2,2
iso17:1w5c	0,03	1,50	0,41	-	-	0,11	0,06	0,03	0,30	0,08	-	-	0,01	0,05	0,12	0,3
iso17:0	10,43	15,90	8,73	11,95	16,79	11,91	12,67	12,80	13,66	18,95	10,46	9,28	12,12	7,99	15,65	7,1
anteiso17:0	0,13	0,01	-	-	0,17	-	0,07	0,06	0,15	0,06	0,46	-	0,12	0,04	-	0
iso18:0	1,40	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57	-	0,13	-	-	0,5
OAG Fettsäuren																
14:0	0,16	2,09	2,00	2,03	1,98	0,78	0,81	1,39	0,88	1,20	0,15	1,53	1,78	1,45	1,41	-
iso15:0_OAG	5,48	10,06	3,37	4,91	3,29	2,32	2,38	4,10	3,83	4,07	3,48	4,83	3,82	4,27	3,52	4,9
15:0_OAG	-	-	-	0,05	0,03	0,03	0,02	0,03	0,06	-	-	-	-	-	-	0,8
iso16:0_OAG	1,61	0,65	0,07	0,18	0,13	0,15	0,05	0,10	0,38	0,10	1,88	0,17	0,13	0,40	0,07	-
16:1_OAG	10,63	10,62	13,90	5,13	8,62	9,73	9,72	6,15	8,64	7,91	9,51	9,70	8,81	10,36	7,11	0,6
16:0_OAG	8,15	0,82	8,52	8,99	5,57	3,19	4,53	9,33	7,05	1,19	7,49	2,84	3,17	4,80	1,56	0,9
17:0_OAG_	1,71	0,67	0,72	2,02	0,55	0,83	0,82	1,56	2,88	1,66	0,91	0,87	0,58	1,81	1,13	-

Die Typstämme zeigen jeweils ein charakteristisches Muster an produzierten Fettsäuren. Innerhalb der Gattung *Sorangium* besteht eine größere Ähnlichkeit als zu der Gattung *Byssovorax*. Die Abbildung 35 veranschaulicht die Ergebnisse der Fettsäureprofilbestimmung

in einer Heatmap. Durch einen Farbcode (rot zu blau) wird für die Fettsäurezusammensetzung jedes Stammes ein Muster generiert. Je ähnlicher die Farbmuster zweier Stämme, desto kongruenter ist die Fettsäurezusammensetzung.

Auch bei dieser Darstellung wird deutlich, dass die Typstämme individuelle Fettsäureprofile besitzen. Die Verwandtschaftsbeziehungen werden durch die Länge der Äste des Dendrogramms am oberen Bildrand veranschaulicht. Hierbei findet die Abzweigung zu dem Stamm *B. cruenta* DSM 14553^T, wie erwartet, am Beginn des Baumes statt, da es sich um eine andere Gattung handelt. Die Typstämme untereinander zeigen mehr oder weniger gleichmäßige Abstände der Verzweigungen. Am ähnlichsten in ihrer Fettsäurekomposition sind sich demnach die Stämme Soce 134 und Soce 375. Der bisher validierte Typstamm Soce 1871 clustert mit dem Stamm Soce 1078, d.h., dass diese beiden Stämme eine ähnliche Fettsäurezusammensetzung besitzen.

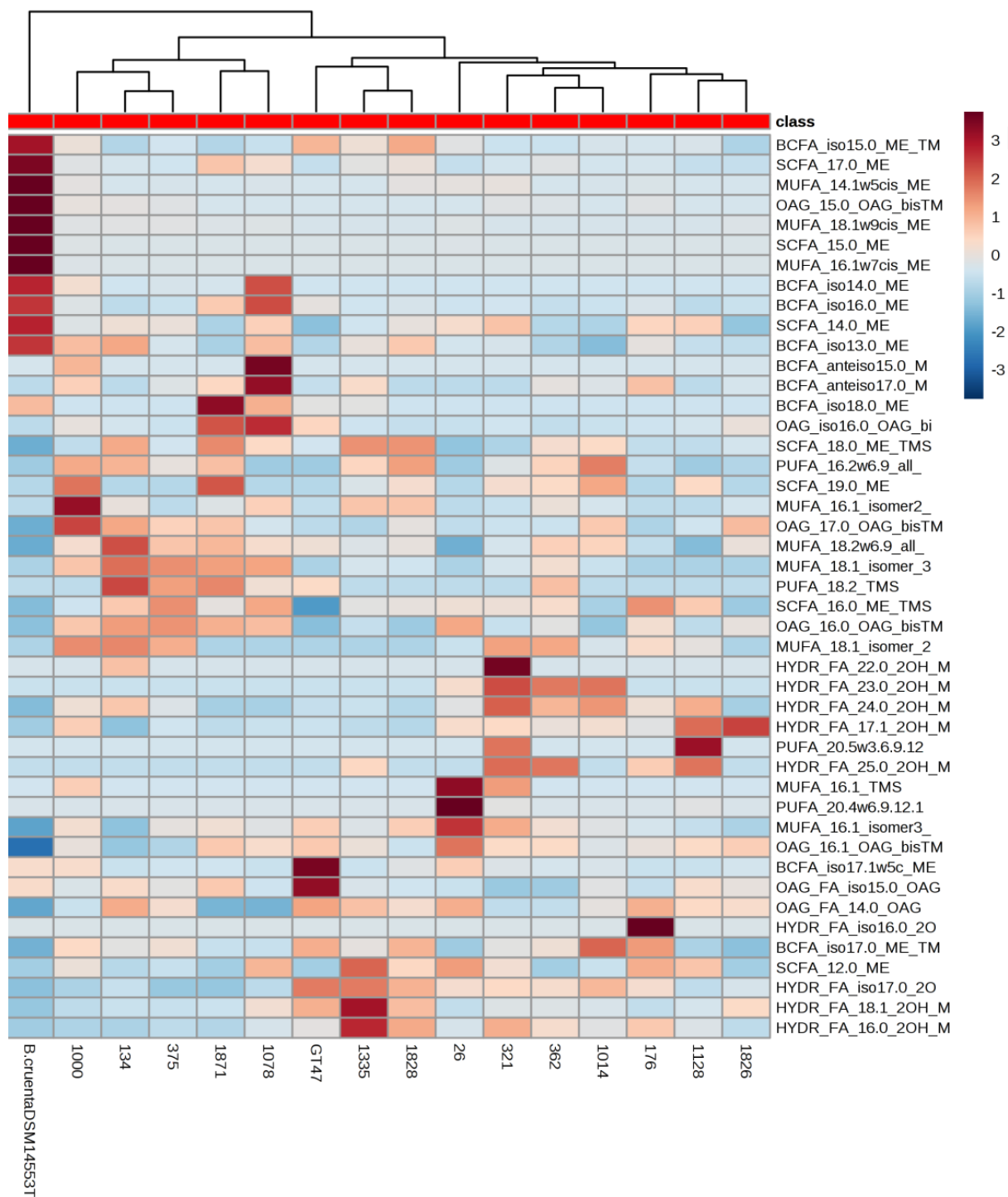


Abbildung 35 Heatmap der Fettsäureprofile der putativen Typstämme.

3.8 Phospholipidprofile der 15 putativen Typstämme

Phospholipide zählen neben den Fettsäuren zu den chemotaxonomischen Markern und können, zusammen mit phänotypischen und genotypischen Charakterisierungen, Hinweise auf die Phylogenie eines Organismus geben.

Um die Phospholipide der ausgewählten 15 Typstämme zu charakterisieren, wurden die Phospholipide aus der lyophilisierten Zellmasse wie 2.2.7.2 extrahiert und mittels DC aufgetrennt. Um einen Vergleich der Lipidmuster zu gewährleisten, wurde auf eine hochstandardisierte Durchführung geachtet, um die Bedingungen konstant zu halten. Die Visualisierung der organischen Bestandteile der Extrakte erfolgte mit unterschiedlichen Nachweisreagenzien. Mit Molybdatophosphorsäure wurden die Gesamtlipide der Proben sichtbar gemacht, indem die Kieselgelplatten mit dem Reagenz besprüht und für 5 min auf 100 °C erhitzt wurden. Auf einer weiteren Platte pro Isolat wurden mit Hilfe von Ninhydrin die Lipide mit freien Aminogruppen markiert. Anschließend wurden die Ninhydrinplatten mit Molybdänblau, dem Dittmer-Lester Reagenz, behandelt. Das Molybdänblau macht die enthaltenen Phospholipide auf den Kieselgelplatten sichtbar. Die Kieselgelplatten wurden jeweils fotografiert und anschließend die farbigen Punkte anhand eines Standards identifiziert.

3.8.1 Nachweise der Gesamtlipide mit Molybdatophosphorsäure

Die Nachweismethodik mit Molybdatophosphorsäure liefert einen Gesamtüberblick über die, in der Probe enthaltenen, polaren Lipide (s. Abb. 36). Alle Typstämme enthalten Diphosphatidylglycerol (DPG, rot markiert), Phosphatidylglycerol (PG, blau markiert) sowie Phosphatidylethanolamin (PE, grün markiert). Die ähnliche Anordnung dieser Lipidpunkte auf den Platten zeigt, dass die Lipidmuster aufgrund von korrekter Durchführung der 2D-DC ausgewertet und miteinander verglichen werden können. Neben den Lipiden, die in allen Stämmen vorkommen, zeigen sich, bezogen auf die weiteren Lipide jedoch große Unterschiede. So enthalten die Stämme Soce 1000 und Soce 176 kein Phosphatidylserin (PS) und die Stämme Soce 1000 und Soce 1078 keine Glykolipide, wohingegen alle anderen Typstämme ein bis zwei Glykolipide enthalten. Insgesamt ist die Diversität sehr hoch. Vergleicht man die Stämme Soce 1078 und Soce 176 miteinander, stellt man fest, dass die Anzahl der unterschiedlichen Lipide

bei Soce 176 erhöht ist. Insgesamt sind 18 verschiedene Molekülgruppen vorhanden. Der Stamm Soce 1078 weist lediglich 8 unterschiedliche Lipidarten auf.

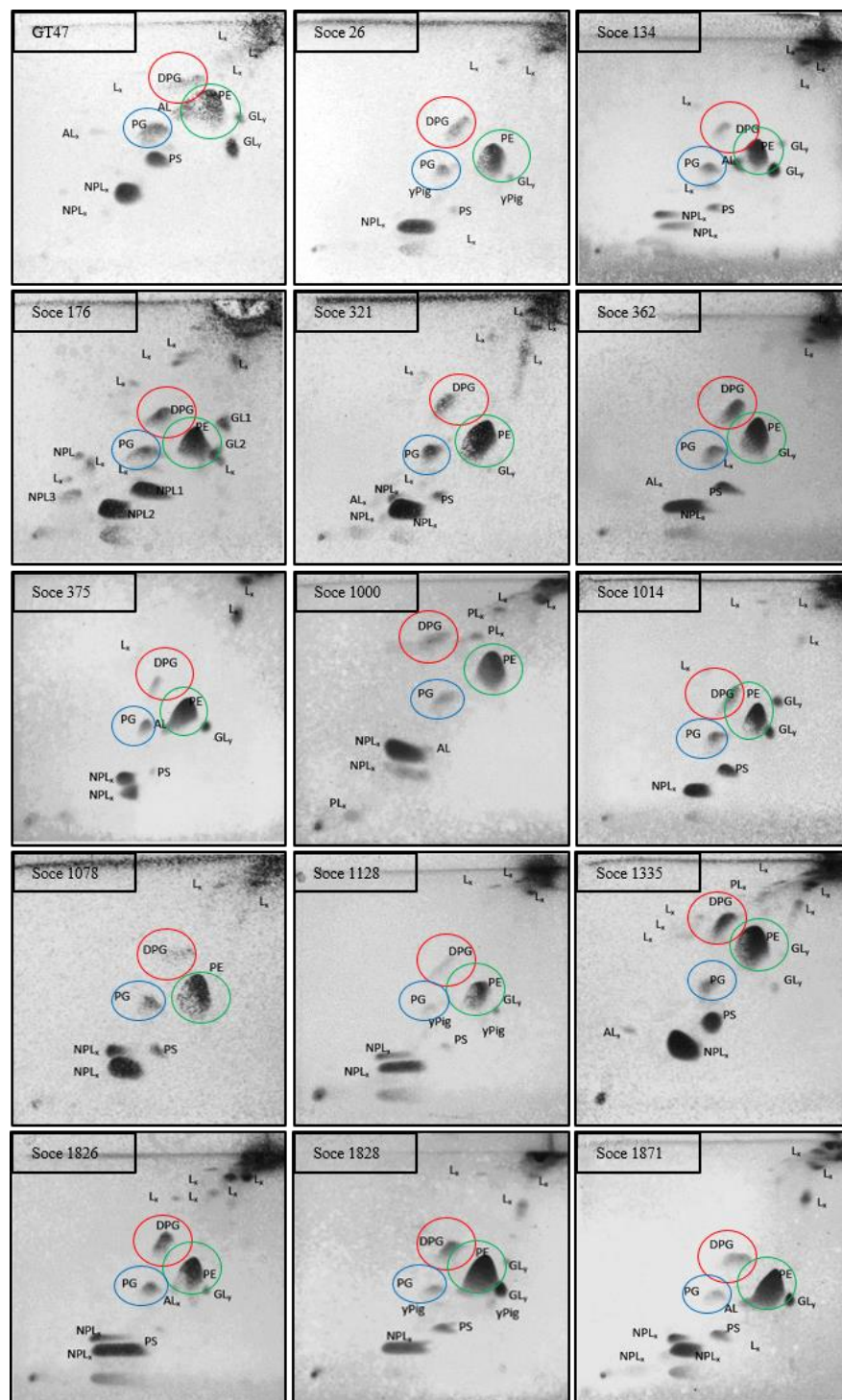


Abbildung 36 Nachweis der Gesamtlipide mit Molybdatphosphorsäure. Alle in der Probe enthaltenen Lipide wurden durch das Reagenz sichtbar gemacht und anschließend markiert. AL: Aminolipid; L_x: unbekanntes Lipid; GL_x: unbekanntes Glycolipid; yPig: gelbes Pigment; NPL_x: Ninhydrinpositives Phospholipid; DPG (rot): Disphosphatidyl-Glycerol; PE (grün): Phosphatidylethanolamin; PG (blau): Phosphatidylglycerol; PS: Phosphatidylserin.

3.8.2 Ninydrin-Nachweis der Lipide mit freier Aminogruppe

Die Behandlung der Kieselgelplatten mit Ninhydrin führt dazu, dass die aminohaltigen Lipide in der Probe sichtbar werden. Abbildung 37 zeigt, dass jeder Stamm das Hauptlipid Phosphatidylethanolamin enthält. Die weitere Zusammensetzung unterschiedlicher Aminolipide variiert jedoch von Stamm zu Stamm. Auf den Kieselgelplatten sind jeweils zwei bis fünf weitere Aminolipide und zeigen so für jeden Stamm ein individuelles Lipidmuster.

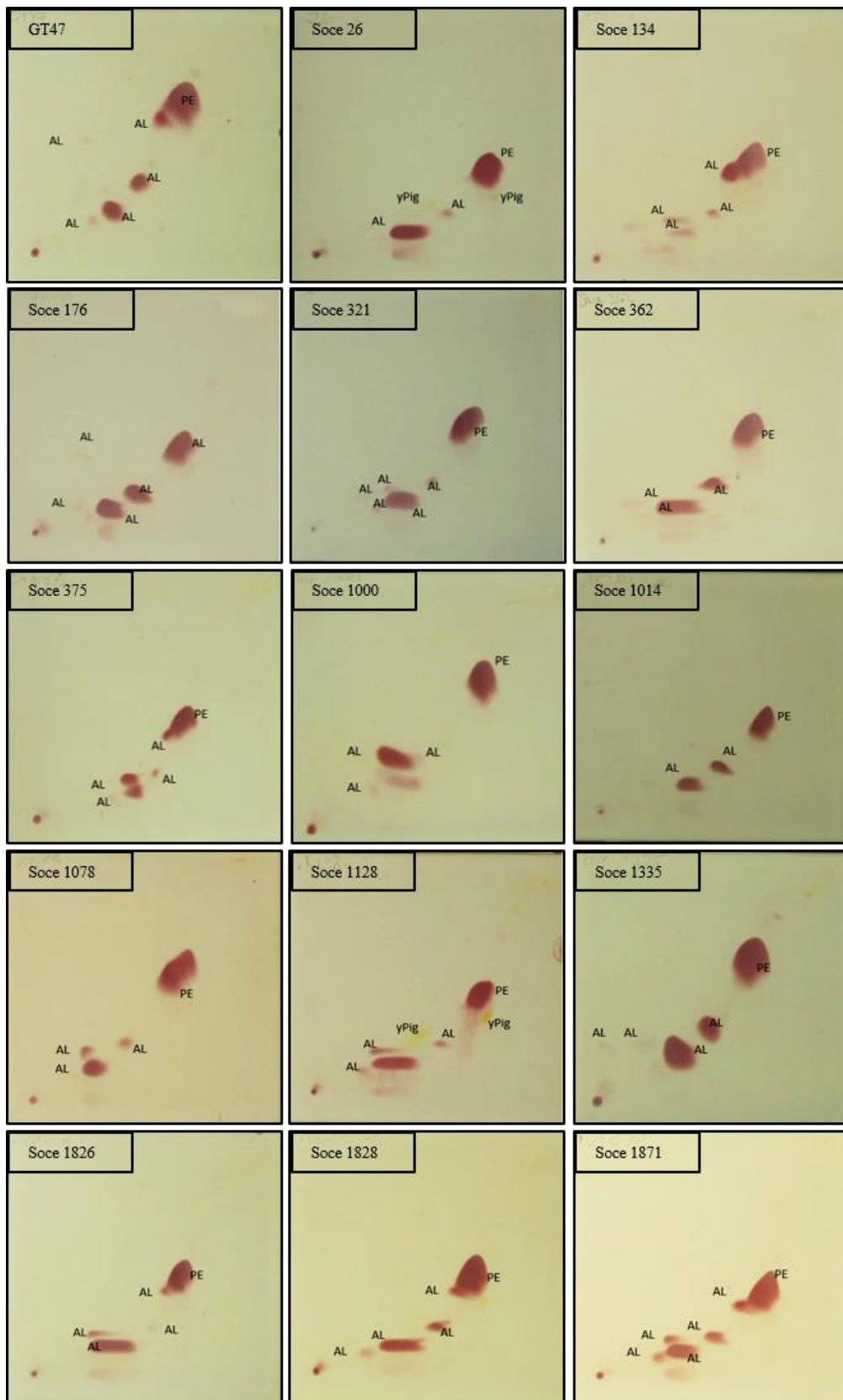


Abbildung 37 Nachweis der aminohaltigen Phospholipide mit Ninhydrin. Alle Stämme enthalten einen großen Anteil an Phosphatidylethanolamin und eine unterschiedliche Anzahl weiterer Aminolipide. AL: Aminolipid; yPig: gelbes Pigment; PE: Phosphatidylethanolamin.

3.8.3 Nachweis der Phospholipide mit dem Dittmer-Lester-Reagenz

Die in den Proben enthaltenen Phospholipide werden mit Molybdänblau nachgewiesen. Die Lipide, die sowohl mit Ninhydrin als auch mit Molybdänblau reagieren, werden als ninhydrinpositive Phospholipide (NPL) bezeichnet. Andere unbekannte Phospholipide sind mit PL gekennzeichnet. Wie schon bei der Gesamtfärbung erkennbar, enthalten alle Stämme die Lipide Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol. Die in Abschnitt 3.8.2 identifizierten Aminolipide werden als NPL auch bei diesem Nachweis sichtbar. Es fällt auf, dass der Stamm Soce 1000 zwei weitere, unbekannte Phospholipide enthält, die Stämme Soce 176 und Soce 1335 jeweils ein weiteres (s. Abb. 38).

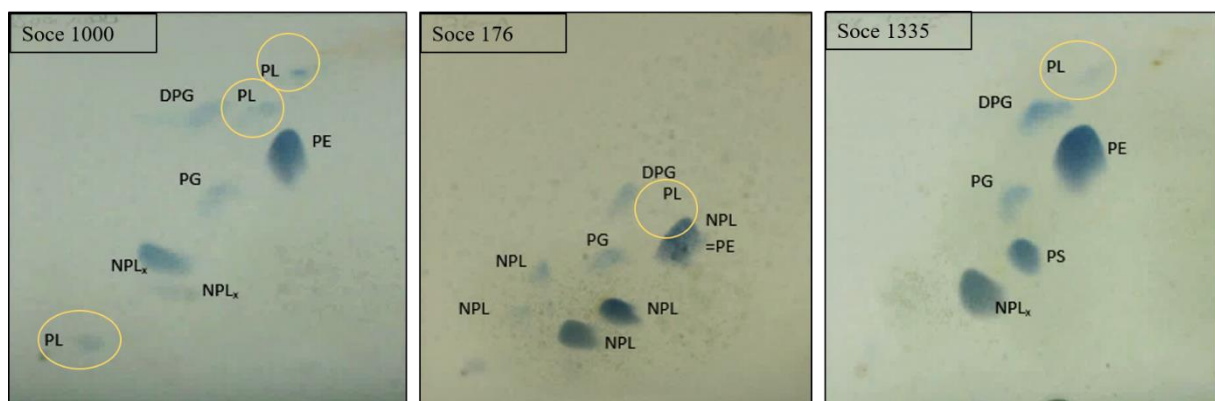


Abbildung 38 Individuelle Phospholipidmuster der Stämme Soce 1000, Soce 176 und Soce 1335. Die Stämme variieren stark in der Anzahl und Art der enthaltenen Phospholipide. PL (gelb): unbekanntes Phospholipid; NPL_x: Ninhydrinpositives Phospholipid; DPG: Disphosphatidyl-Glycerol; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PS: Phosphatidylserin.

Eine Kongruenz der Lipidmuster besteht zwischen den Stämmen Soce 26, Soce 362 und Soce 1014. Sie gleichen sich in der Art und Anzahl der Phospholipidpunkte. Auch die Stämme Soce 375, Soce 134, Soce 1078, Soce 1128, GT47, Soce 1828 und Soce 1826 weisen diesbezüglich untereinander eine hohe Übereinstimmung des Phospholipidmusters auf. Die Stämme Soce 321 und Soce 1871 gleichen sich ebenfalls stark, da sie, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Stämmen, drei unbekannte, ninhydrinpositive Phospholipide an ähnlicher Position aufweisen (s. Abb. 39).

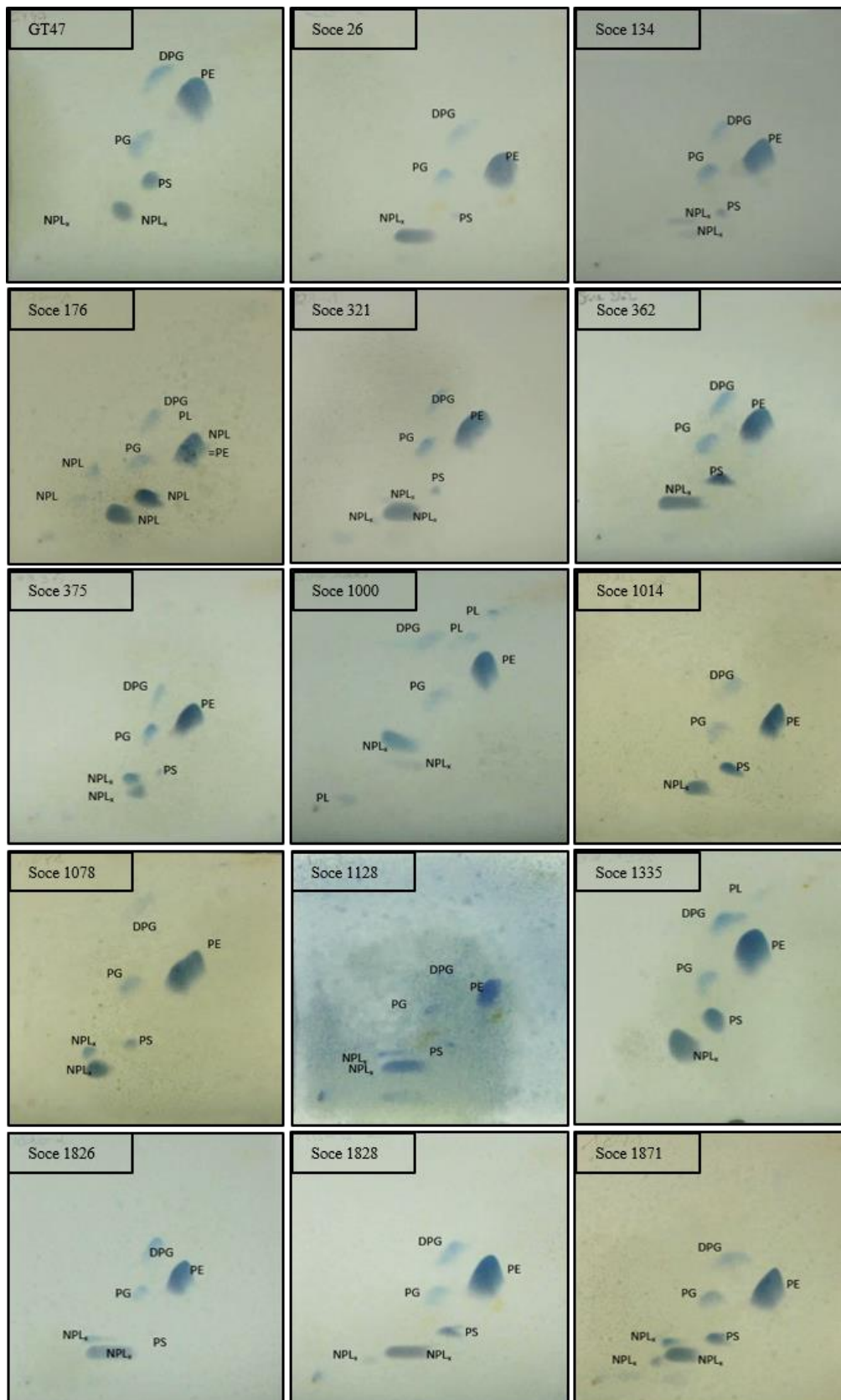


Abbildung 39 Phospholipidmuster der 15 untersuchten Typstämme, sichtbar gemacht mit Molybdänblau. PL (gelb): unbekanntes Phospholipid; NPL_x: Ninhydrinpositives Phospholipid; DPG: Disphosphatidyl-Glycerol; PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol; PS: Phosphatidylserin.

4 Diskussion

Die polyphasische Taxonomie wurde in den letzten Jahrzehnten für unterschiedliche Bakteriengattungen und -familien, zum Beispiel *Bacillus* und *Campylobacter*, durchgeführt und etabliert (Das *et al.* 2014). Im Gegensatz zu der reinen 16S rRNA-Gensequenzanalyse zur phylogenetischen Einordnung der Bakterienisolate, stellt die polyphasische Herangehensweise eine umfangreiche genotypische, phänotypische und chemotypische Untersuchung der Organismen dar. In dieser Arbeit wird die Aussagekraft der polyphasischen Taxonomie auf Mitglieder der Ordnung Myxococcales untersucht, genauer auf die Gattung *Sorangium*. Als Basis der Charakterisierung dienten die Sequenzen des 16S rRNA-Gens sowie, des für Sorangien spezifischen, Zellulasegens *xynB1* und das ubiquitär vorkommende Gen für das hochkonservierte Chaperonin *groEL1* (Lee *et al.* 2010). Die DDH, derzeit noch der Goldstandard für phylogenetische Einordnungen, wurde mit 15 neu definierten Typstämmen, welche jeweils die Charakteristika der Mitglieder ihrer Klade repräsentieren, durchgeführt. Es handelt sich um die Stämme GT47, Soce 26, Soce 134, Soce 176, Soce 321, Soce 362, Soce 375, Soce 1000, Soce 1014, Soce 1078, Soce 1128, Soce 1335, Soce 1826, Soce 1828. Der validierte Typstamm Soce 1871 wurde ebenfalls als Vertreter einer Klade ausgewählt.

Zusätzlich wurde eine Analyse der produzierten Sekundärmetabolite der potentiellen Typstämmen durchgeführt. Alle Stämme wurden zudem auf unterschiedlichen Nährmedien mit unterschiedlichen Nährstoffquellen angezogen, um eine mögliche, verwandtschaftliche Einordnung aufgrund der Koloniefärbung vorzunehmen. Die enzymatische Aktivität der 73 Stämme wurde mittels APIZYM[®] Teststreifen bestimmt. Desweiteren wurden mit den neu definierten Typstämmen Fettsäure- und Phospholipidanalysen durchgeführt, um neben der MALDI-TOF/MS Untersuchung der Expressionsmuster, eine umfangreiche chemotypische Charakterisierung der Sorangien zu gewährleisten.

Die Methoden zeigen unterschiedlich hohe Auflösungen bezüglich der taxonomischen Einordnung. Das Zusammenführen und Vergleichen der Analysen ergibt ein umfangreiches Bild über den möglichen Verwandtschaftsgrad der Isolate und erleichtert und untermauert die Einteilung der Gattung *Sorangium* in mehrere, distinkte Spezies.

4.1 Unterteilung der Gattung *Sorangium* in unterschiedliche Spezies auf Basis der Morphologie

Die Gattung *Sorangium* wurde in den vergangenen Jahrzehnten mehrmals, aufgrund der Fruchtkörperfärbung, in unterschiedliche Subspezies, unterteilt. Shimkets *et al.* fasste im Jahr 2006 diese Hypothesen zusammen, indem er postulierte, die Gattung ließe sich in drei Arten aufteilen: *Sorangium compositum* (orange), *Sorangium cellulosum* (braun) und *Sorangium nigrum* (nahezu schwarz). Es fand jedoch keine Validierung dieser neu definierten Arten statt. Yan *et al.* unterteilte die Gattung *Sorangium* auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzunterschiede und konnte zeigen, dass die, auf diese Art gebildeten, Kladen, kein einheitliches morphologisches Bild bezüglich der Fruchtkörperfärbung aufwiesen (Yan *et al.* 2003).

Wie in Abschnitt 3.4.1 veranschaulicht, zeigen die in dieser Arbeit neu definierten Kladen der Gattung *Sorangium* jede für sich ebenfalls kein einheitliches, morphologisches Bild. Die Stämme Soce 1871 und Soce 341 sind auf *xynB1*- sowie 16S rRNA-Gen Ebene sehr nah miteinander verwandt (s. Abb. 40).

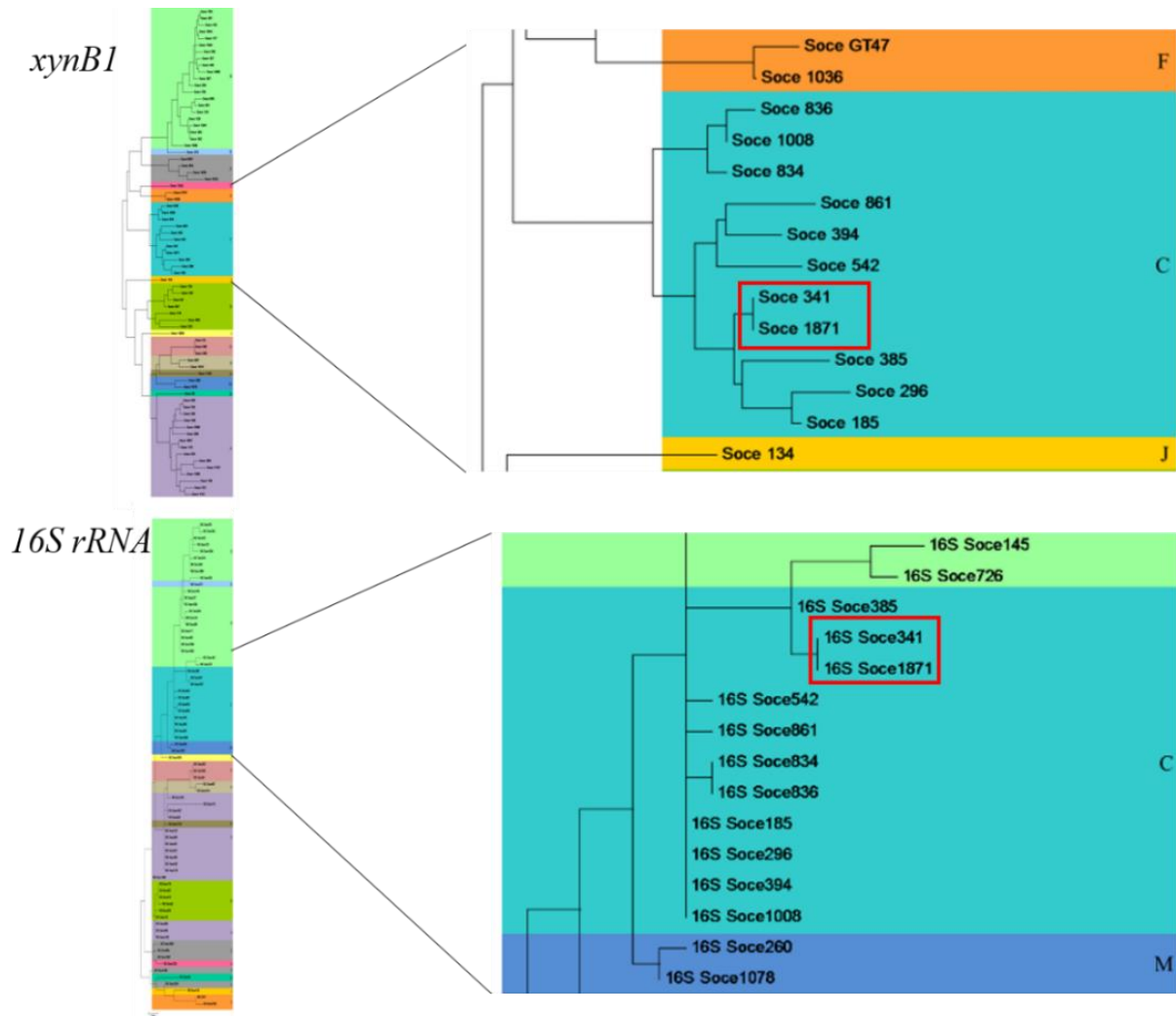


Abbildung 40 Darstellung der hohen Similarität der Sequenz des *xynB1*-Gens (oben) und der Sequenz des 16S rRNA-Gens (unten) zwischen den Stämmen Soce 1871 und Soce 341.

Betrachtet man die Färbung und das Schwarmverhalten der beiden Stämme, so stellt man jedoch große Unterschiede fest: Der aktuelle Typstamm der Spezies *S. cellulorum*, Soce 1871, bildet nach der Animpfung aus einer Kryokonserven hell orangefarbene Fruchtkörper auf VY/2 Nährmedium und zeigt ein unregelmäßiges Schwarmverhalten (s. Abb. 37, C und D). Der nahverwandte Stamm 341 hingegen bildet schwarzbraune und farblose Kolonien und schwärmt gleichmäßig von der Mitte der Agarplatte zum Rand aus (Abb. 37, A und B).

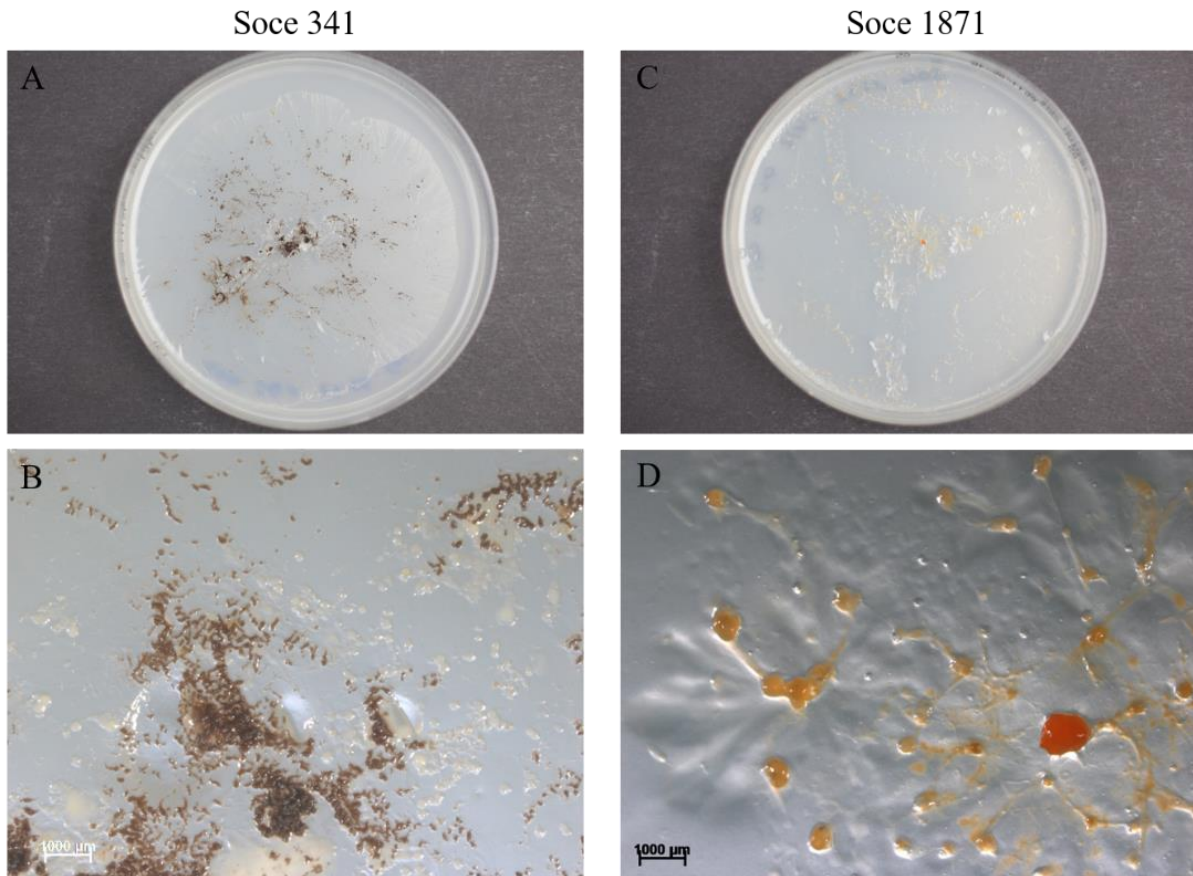


Abbildung 41 Phänotypisches Erscheinungsbild der Stämme Soce 1871 und Soce 341 auf VY/2 Nährmedium. A und B: Soce 341; C und D: Soce 1871.

Auch die Stämme Soce 281 und Soce 764 aus der Klade A sind laut der drei phylogetischen Stammbäume sehr eng miteinander verwandt. Vergleicht man jedoch die Morphologie der beiden Stämme, so sieht man auch hier, dass sich das Erscheinungsbild auf VY/2 Medium stark voneinander unterscheidet (s. Abb. 42). Der Stamm Soce 281 bildet orangefarbene Fruchtkörper und schwärmt punktförmig aus (Abb. 42 A und B), wohingegen der Stamm Soce 764 fächerförmig/ strahlenförmig ausschwärmt und orange, braune und schwarze Fruchtkörper bildet (Abb. 42 C und D).

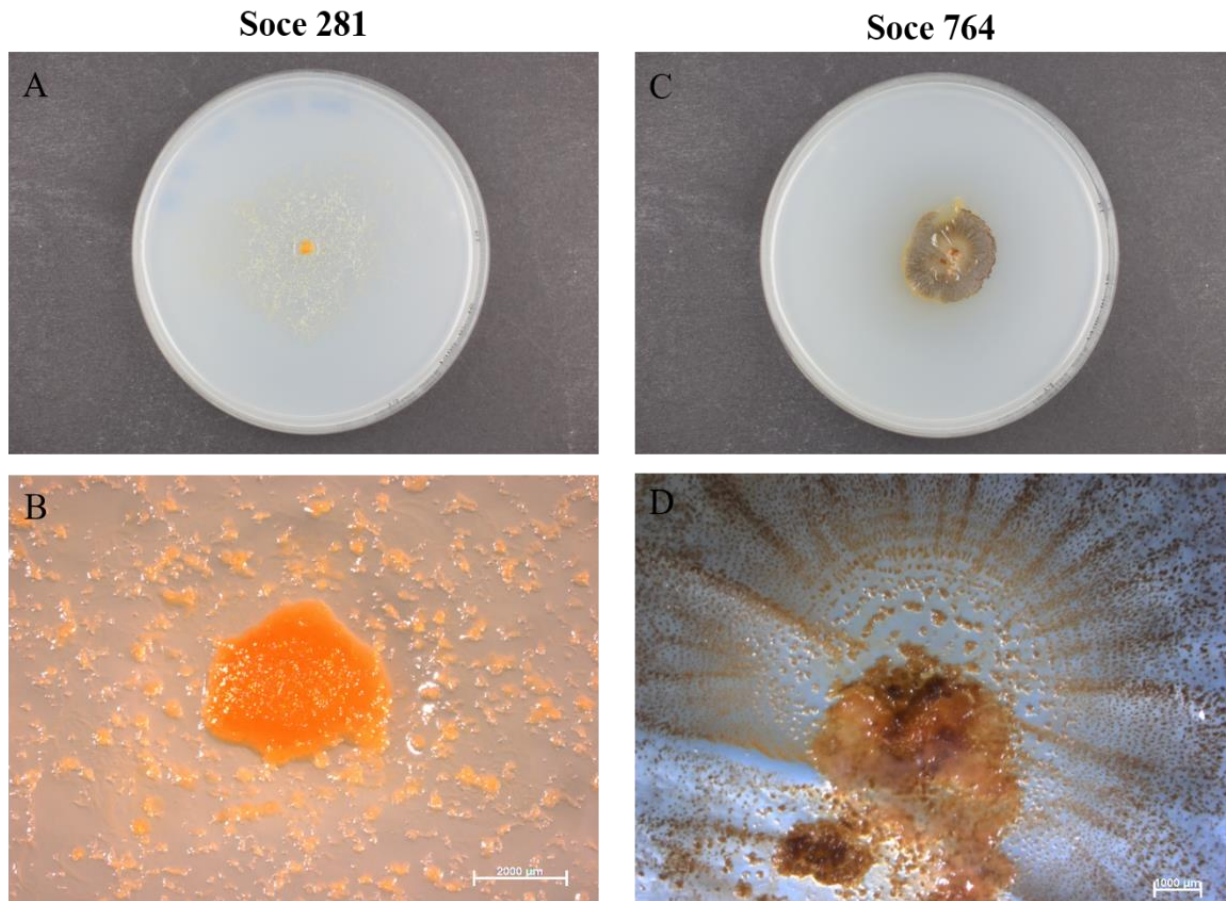


Abbildung 42 Phänotypisches Erscheinungsbild der Stämme Soce 281 und Soce 764 auf VY/2 Nährmedium.
A und B: Soce 281; C und D: Soce 764.

Im Gegensatz zu der Hypothese von Shimkets *et al.* aus dem Jahre 2006, die Sorangien ließen sich Aufgrund der Färbung in drei unterschiedliche Spezies unterteilen, zeigt die vorliegende Arbeit, dass eine Klassifizierung ausschließlich auf Basis der Morphologie nicht möglich ist. So weisen mehrere Isolate Mischfarben auf, die von orange bis braun, oder braun bis schwarz reichen. Eine simple Unterteilung der Isolate nach den Farben „orange“, „braun“ und „schwarz“ konnte mittels der durchgeführten Analysen nicht bestätigt werden. Um die Färbung der Zellmasse und der Fruchtkörper zu vergleichen, wurden die Isolate auf VY/2 Nährmedium unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Der Vergleich wurde nach fünf Wochen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt eine hohe Vitalität und ein ausgiebiges Schwarmverhalten der untersuchten Sorangien zu beobachten war. Um auszuschließen, dass die Stämme aufgrund unterschiedlich schnellen Wachstums und damit verbundener verzögerter Pigmentbildung falsch charakterisiert werden, wurden die Platten weitere vier Wochen inkubiert. Bei keinem der Isolate konnte jedoch eine spätere Verfärbung der Kolonien oder der

Fruchtkörper beobachtet werden. Bei den vergleichenden Untersuchungen wurde jeweils nur das Wachstum auf dem gleichen Medium miteinander verglichen. Das Schwarmverhalten von Myxobakterien ist auf nährstoffarmen Medien, wie beispielweise VY/2 oder Wasserager mit *E. coli* als Nahrungsquelle, sehr ausgeprägt. Die Zellmassenproduktion hingegen ist gering. Pigmentierte Zellen bilden folglich nur einen dünnen Film, welcher farblos oder leicht gefärbt ist. Zellreiche Fruchtkörper oder Schwarmränder hingegen sind meist intensiver gefärbt. Dennoch ist die Farbintensität der Kultur in der Regel weniger stark ausgeprägt als beispielsweise auf nährstoffreichem P Medium. Hier zeigen die Myxobakterien kaum Schwarmaktivität, dafür aber eine ausgeprägte Zellmassenproduktion. Diese führt aufgrund der vielen Zellschichten bei pigmentierten Stämmen zu meist ausgeprägter Farbintensität.

4.1.1 Unterteilung der Gattung *Sorangium* auf Basis der polyphasischen Taxonomie

Seit Jahrzehnten besteht die Hypothese, dass sich die Gattung *Sorangium* in mehrere Spezies aufgliedert. Derzeit ist der einzige validierte Vertreter dieser Art *Sorangium cellulosum*. In dieser Arbeit wurde erstmals ein polyphasischer Ansatz angewendet, welcher konventionelle und moderne molekularbiologische Methoden bezüglich phänotypischer, genotypischer und chemotypischer Analysen vereint (Das *et al.* 2014). Diese Kombination gewährleistet eine hinreichende Aussagekraft zur Unterteilung der Gattung *Sorangium* in mehrere Arten.

4.1.1.1 Phylogenetische Stammbäume auf Basis des 16S rRNA-, *xynB1*- und *groEL1*-Gens

Die Sequenzhomologie des 16S rRNA-Gens der 73 untersuchten Stämme lag, wie auch für andere Stämme in der Literatur beschrieben, bei über 97 % (Jiang *et al.* 2008). Ähnlich wie bei Actinobakterien, reicht dieses Merkmal bei einigen Myxobakteriengattungen nicht aus, um Arten abzugrenzen, zu charakterisieren und zu definieren. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb, neben dem 16S rRNA-Gen, die hochkonservierten Gene *xynB1* (Zellulase) und *groEL1* (Chaperon) amplifiziert und sequenziert. Mit den darauf resultierenden Sequenzen

wurden phylogenetische Bäume errechnet. Eine Gegenüberstellung dieser drei Stammbäume machte die Einteilung der Gattung *Sorangium* in mehrere Kladen möglich.

4.1.1.2 Enzymaktivitätsbestimmung mittels APIZYM®

Eine Untersuchung der Enzymaktivität mittels APIZYM® untermauerte diese Einteilung der Kladen auf Basis des *xynBI*-Gens. Einige, komplette Kladen weisen die Aktivität des Enzyms N-acetyl- β -Glukosaminidase nicht auf.

4.1.1.3 MALDI-TOF/MS Analyse

Bei der MALDI-TOF/MS wird die Ähnlichkeit der Massenspektren der großen Biomoleküle, hauptsächlich der ribosomalen Proteine, detektiert und in einem Dendrogramm dargestellt. Diese Methode wird standardmäßig zur Identifizierung von, hauptsächlich klinisch relevanten, Isolaten genutzt, um diese phylogenetisch auf Gattungs- oder Artebene einordnen zu können. Bei den untersuchten *Sorangium* Stämmen, wird, beim Vergleich des MALDI-TOF/MS Dendrogramms mit den genetischen Stammbäumen, deutlich, dass die Unterteilung nicht ausnahmslos bis auf Speziesebene bei der Gattung *Sorangium* möglich ist. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich die 73 Stämme in vier Kladen aufteilen. Diese decken sich nur teilweise mit denen der genetischen Stammbäume.

Allerdings zeigt das Dendrogramm in Teilabschnitten eine Ähnliche Aufteilung wie die phylogenetischen Stammbäume. Einige, laut Genanalyse sehr nah verwandte, Stämme, bilden auch in dem MALDI-TOF/MS ein eigenes Cluster.

Es ist durchaus möglich, dass ein MALDI-TOF/MS Dendrogramm sich nicht mit einem phylogenetischen Baum deckt, welcher durch die Sequenzunterschiede im 16S rRNA Gen berechnet wurde. Die taxonomische Auflösung der Methode findet ihre Limitierung bei einer 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit von 97-99 % (Schumann und Maier 2014, Welker und Moore 2011). Da viele der in dieser Arbeit verwendeten Stämme eine Sequenzähnlichkeit auf 16S rRNA-Gen Ebene von bis zu 99,4 % aufweisen, konnte das MALDI-TOF/MS Dendrogramm nicht als Argumentationsgrundlage für weitere Klassifizierungen herangezogen werden.

4.1.1.4 DNA-DNA-Hybridisierung

Aus den 15 definierten Kladen wurden 15 Typstämme gewählt, welche jeweils repräsentativ für ihre jeweilige Klade stehen. Mit diesen Stämmen wurde eine DDH durchgeführt, um die Einteilung in eigenständige Arten zu untermauern. Der Schwellenwert zur Abgrenzung einer neuen Art liegt bei der DDH-Methode bei 70 % Ähnlichkeit. Höhere Werte deuten auf die Einteilung des untersuchten Stammes in die Spezies des Hybridisierungspartners hin. Hybridisiert wurde gegen den validierten Typstamm von *S. cellulorum*, Soce 1871. Die untersuchten, potentiellen Typstämme liegen, bis auf den Stämme Soce 1014, Soce 1078, Soce 1128 und Soce 1335 alle unter der 70 % Grenze. Die Abbildung 38 zeigt die Werte der DDH zusammen mit den Ergebnissen des 16S rRNA-Gensequenzvergleichs innerhalb eines Diagramms in Prozent.

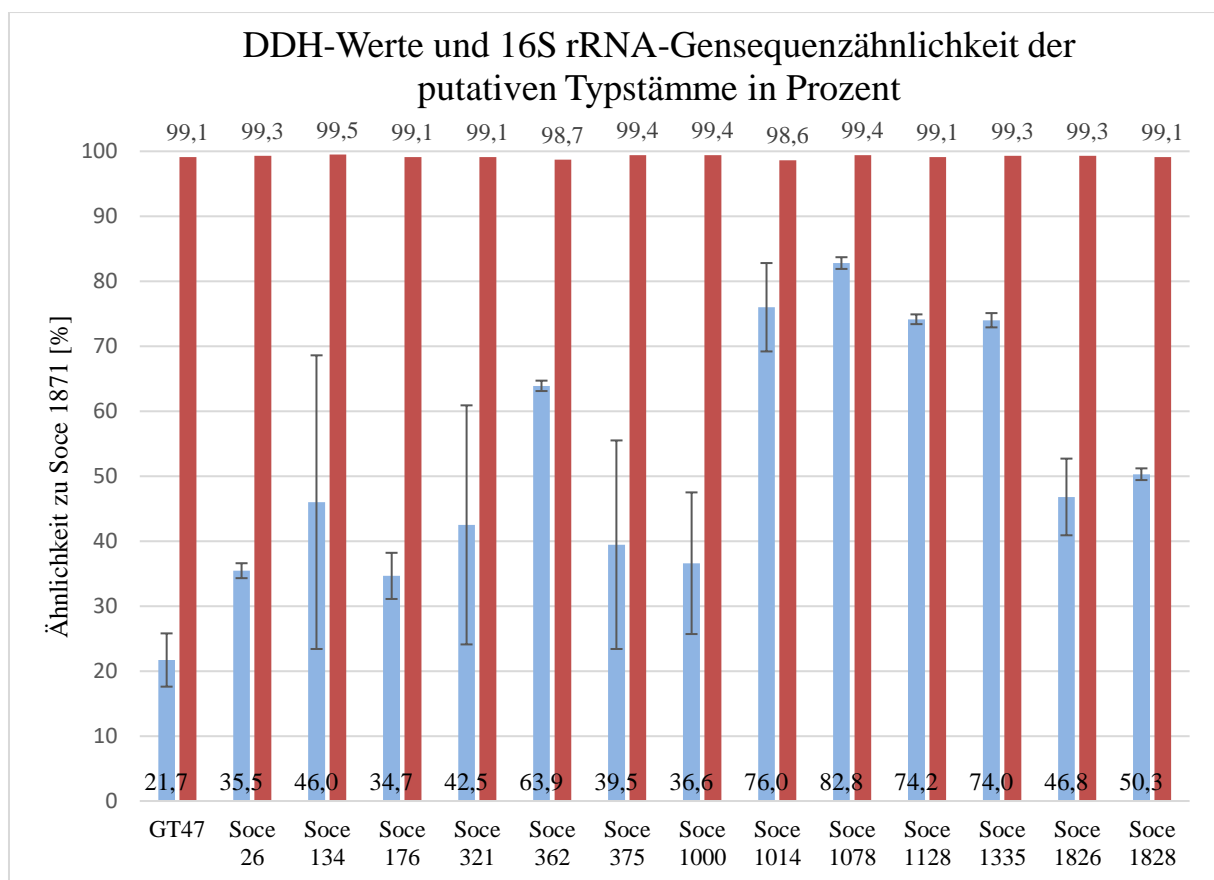


Abbildung 43 Vergleich der Hybridisierungswerte der DDH (blau) mit 16S rRNA-Gensequenzhomologie (rot).

Zusammen mit den Ergebnissen der phylogenetischen Analysen, wird durch die Ergebnisse der DDH die Hypothese bestätigt, dass es sich bei den ausgewählten, putativen Typstämmen GT47, Soce 26, Soce 134, Soce 176, Soce 321, Soce 362, Soce 357, Soce 1000, Soce 1826 und Soce 1828 um eigenständige Spezies innerhalb der Gattung *Sorangium* handelt. Um dies zu untermauern, ist jedoch eine Hybridisierung aller putativen Typstämme untereinander notwendig, um diese eindeutig voneinander abgrenzen zu können.

4.1.1.5 Serienverdünnungstests und Bestimmung der biologisch aktiven Substanzen

Vertreter der Gattung *Sorangium* produzieren eine Vielfalt an unterschiedlichen, biologisch aktiven Sekundärmetaboliten (Gerth *et al.* 2003). Lee *et al.* zeigte im Jahr 2013, dass die, auf Basis des Zellulasegens *xynB1* und des 16S rRNA-Gens, eingeteilten monophyletischen Kladen jeweils über individuelle Sets an Sekundärmetabolitclustern verfügen.

Um die Unterschiede zwischen den, in dieser Arbeit ausgewählten, Typstämmen zu belegen, wurde ein Serienverdünnungstest und eine Bestimmung der produzierten, bekannten Sekundärmetaboliten durchgeführt. Hierbei zeigte jeder Stamm ein individuelles Hemm- bzw. Produktionsmuster. Eine Charakterisierung der Stämme aufgrund deren Expressionsmuster bezogen auf Sekundärmetabolite, gestaltet sich schwierig. Viele unterschiedliche, äußere Faktoren können die Ergebnisse des Tests beeinflussen. Die Produktion der unterschiedlichen, bioaktiven Substanzen ist stark abhängig von der Kultivierung des Stammes, d.h. von der Wahl des Mediums und der Inkubationszeit. Unterscheiden sich die Stämme bezüglich Ihrer Vitalität zum Zeitpunkt der Analyse, ist ein direkter Vergleich der Sekundär-metabolitproduktion nur bedingt aussagekräftig.

Geeigneter ist eine Analyse der spezifischen Gencluster der Sekundärmetabolite. Diese Methodik ist unabhängig von der Expression eben dieser Gene und ermöglicht eine detailliertere Charakterisierung eines Stammes bezogen auf das Potenzial, diverse Sekundärmetabolite produzieren zu können. Eine Vollgenomsequenzierung und die damit verbundene Genclusteranalyse erleichtert somit die taxonomische Eingruppierung der Stämme. Zusätzlich könnte eine Untersuchung der Sekundärmetabolitproduktion aller untersuchten

Stämme ebenfalls zeigen, ob die unterschiedlichen Klade über unterschiedliche Sekundärmetabolitprofile verfügen (Lee *et al.* 2013).

4.1.1.6 Fettsäureanalyse

Die Fettsäureanalyse ist eine traditionelle, schnelle und günstige Methode, um Bakterien in unterschiedliche Taxa einzuteilen (Vandamme *et al.* 1996). Bakterienarten und -gattungen unterscheiden sich untereinander hinsichtlich der Verzweigungen, Substituenten und der Positionen der Doppelbindungen der produzierten Fettsäuren (Suzuki *et al.* 1993).

Myxobakterien sind dafür bekannt, einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) zu produzieren. Garcia *et al.* zeigten bereits im Jahr 2011, dass Myxobakterien aufgrund der Produktion von unterschiedlichen Fettsäuren und dessen jeweiliger Quantität in unterschiedliche Taxa eingeteilt werden können. Diese Einteilung deckt sich mit der phylogenetischen Einteilung auf Basis der 16S rRNA-Gensequenz (Garcia *et al.* 2011).

In dieser Arbeit wurde die Methode der Fettsäureanalyse für die putativen Typstämme im Rahmen der polyphasischen Taxonomie angewendet. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte ein, für die Gattung *Sorangium* spezifisches, Ergebnis (Garcia *et al.* 2011). Die Stämme produzierten hauptsächlich die kurzkettige, unverzweigte Fettsäure C16:0 und die iso-verzweigten Fettsäuren iso-C15:0 und iso-C17. Insgesamt zeigten die putativen Typstämme einen sehr Unterschiedlichen Gehalt an den Hauptfettsäuren. Der Stamm GT47 zeigte jedoch einen sehr niedrigen Gehalt an C16:0. Ein Vergleich der Produktion an unterschiedlichen PUFAs zeigt, dass die Stämme jeweils individuelle Fettsäuremuster zeigen. Die ähnlichen Fettsäureprofile der Stämme Soce 1871 und Soce 1078 spiegeln die Ergebnisse der DDH und des 16S rRNA-Gensequenzvergleichs wieder. Die ähnlichsten Fettsäureprofile zeigen die Stämme Soce 134 und Soce 375. Dies spricht für eine nahe Verwandtschaft dieser beiden Stämme, jedoch spricht die Aufteilung der phylogenetischen Stammbäume für eine klare Separation der Stämme in unterschiedliche Klade.

Insgesamt weisen die individuellen Fettsäureprofile ebenfalls, zusammen mit den Ergebnissen der meisten anderen Methoden, auf eigenständige Arten hin.

4.1.1.7 Phospholipidanalyse

Phospholipide dienen, neben den Fettsäuren, ebenfalls als wichtige Biomarker in der polyphasischen Taxonomie (Vandamme *et al.* 1996).

Phospholipidmuster sind charakteristisch für die jeweilige Bakterienart. Wie bei den Fettsäuren, so zeigt auch die Zusammensetzung der Phospholipide den individuellen Charakter der in dieser Arbeit untersuchten, hypothetischen Typstämme. Bei den untersuchten Stämmen konnten diverse Muster an Phospholipidprofilen festgestellt werden. Die Abbildung 44 zeigt, beispielhaft für die Diversität der untersuchten Stämme, die Gesamtlipid- und Phospholipidmuster der Stämme Soce 176 und Soce 1014. Es ist erkennbar, dass der Stamm Soce 176 eine größere Anzahl an unterschiedlichen Lipiden aufweist. So sieht man auf der Kieselgelpplatten vier unterschiedliche, Ninhydrin-positive Phospholipide, wohingegen der Stamm Soce 1014 nur ein einziges Ninhydrin-positives Phospholipid aufweist. Das, bei vielen der untersuchten Stämme, identifizierte Phosphoserin ist jedoch nicht bei Stamm Soce 176 vorhanden. Der Stamm Soce 1078, welcher bei der DDH und der Fettsäureanalyse eine hohe Ähnlichkeit zu Soce 1871 aufwies, zeigt bei der Phospholipidanalyse ein individuelles Muster. Da es sich insgesamt um charakteristische Unterschiede in der Membranzusammensetzung der untersuchten, putativen Typstämme handelt, wird eine Einteilung in unterschiedliche Arten mit dieser Methode untermauert. Die Ähnlichkeiten der Phospholipidprofile der putativen Typstämme untereinander decken sich nicht mit den 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeiten. Dies zeigt, wie wichtig eine Betrachtung anderer Merkmale, neben der 16S rRNA-Gensequenz, für die phylogenetische Einteilung von Myxobakterien ist.

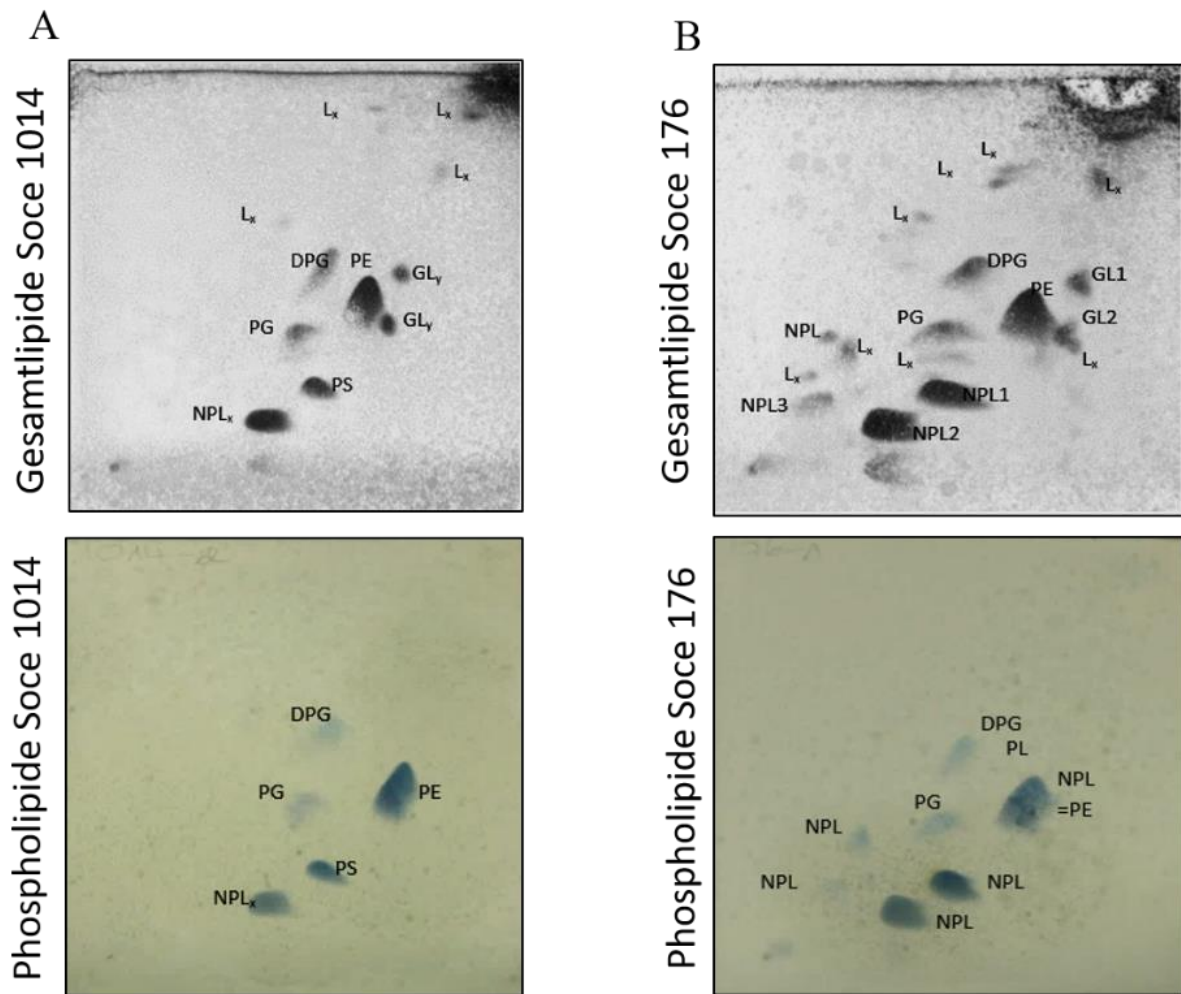


Abbildung 44 Gegenüberstellung der Gesamtlipid- und Phospholipidprofile der Stämme Soce 1014 und Soce 176. Der Stamm 176 weist ein breiteres Spektrum an unterschiedlichen Lipiden auf. L_x: unbekanntes Lipid; GL_x: unbekanntes Glycolipid; yPig: gelbes Pigment; NPL_x: Ninhydrinpositives Phospholipid; DPG (rot): Disphosphatidyl-Glycerol; PE (grün): Phosphatidylethanolamin; PG (blau): Phosphatidylglycerol; PS: Phosphatidylserin.

4.1.2 Neu definierte Spezies

Insgesamt zeigten 4 der 14 putativen Typstämme, die mit Soce 1871 hybridisiert wurden, einen Hybridisierungswert, der über 70 %-Grenze liegt.

Der Stamm Soce 1078 zeigt bei der DDH einen hohen Hybridisierungswert (82,8 %) mit dem validierten Typstamm Soce 1871. Auch das Fettsäureprofil beider Stämme ist sehr ähnlich. Beide Stämme sind in den phylogenetischen Bäumen auf Basis von *xynBI* und *groELI* in deutlich voneinander separierte Kladen eingeordnet, wohingegen der Stammbaum auf Basis der 16S rRNA-Gens keine große Distanz zwischen den beiden Stämmen zeigt. Aufgrund der Unterschiede in den Sequenzen der hochkonservierten Gene *groELI* und *xynBI* und unterschiedlichen Phospholipidmustern, wird der Stamm Soce 1078 in dieser Arbeit ebenfalls als neue Art dargestellt. Die Ergebnisse des polyphasischen Ansatzes deuten darauf hin, dass es sich trotz eines hohen DDH-Wertes um eine eigenständige Art handelt.

Die Hybridisierungswerte der Stämme Soce 1014 (76%), Soce 1128 (74,2 %) und Soce 1335 (74,0 %) sprechen, für sich genommen, für eine Zugehörigkeit in die Spezies des Stammes Soce 1871. Allerdings konnte im Rahmen der polyphasischen Untersuchung festgestellt werden, dass sich diese Stämme hinsichtlich ihrer Phospholipid- und Fettsäureprofile stark voneinander unterscheiden. Auch produzieren diese Stämme, wie alle in dieser Arbeit untersuchten, putativen Typstämme, ein anderes Set an biologisch aktiven Sekundärmetaboliten als der Stamm Soce 1871. Alle Stämme, die grenzwertige DDH-Werte zeigen, liegen im *xynBI*-Stammbaum deutlich distanziert von dem Stamm Soce 1871. Dies gilt ebenfalls für den 16S rRNA-Stammbaum, wohingegen die Stämme Soce 1014 und Soce 1078 im *groELI*-Stammbaum sehr nah an Soce 1871 liegen. Aufgrund dieser Unterschiede werden auch diese Stämme als distinkte Spezies aufgeführt. Um diese Einschätzung zu validieren, bedarf es jedoch weiterer Methoden. Durch eine Vollgenomsequenzierung und der damit verbundenen ANI-Analyse und/oder mittels automatischem Ribotyping kann die Artzugehörigkeit der Stämme Soce 1014, Soce 1128, Soce 1078 und Soce 1335 weiter aufgeschlüsselt werden. Der validierte Typstamm Soce 1871 für die Art *S. cellulosum* bleibt bestehen.

Die Benennung der Spezies fand unter Berücksichtigung der Herkunft, des Entdeckers und individuellen Merkmalen statt (s. Tab. 21).

Tabelle 21 Namensvorschläge für die neu definierten Spezies

Typstamm	Namensvorschlag
26	<i>S. soraphenicum</i>
134	<i>S. africanum</i>
375	<i>S. lignolum</i>
1826	<i>S. pallidum</i>
1828	<i>S. reichenbachii</i>
321	<i>S. compositum</i>
1000	<i>S. coloricus</i>
362	<i>S. dawidii</i>
176	<i>S. ambruticinus</i>
1335	<i>S. pilatus</i>
1078	<i>S. lucidum</i>
1128	<i>S. lupus</i>
GT47	<i>S. gerthii</i>
1014	<i>S. agricus</i>

4.2 Vergleich der angewandten Methoden im Hinblick auf die taxonomische Auflösung

Die im polyphasischen Ansatz angewandten Methoden tragen mehr oder weniger ihren Teil zur phylogenetischen Einordnung der untersuchten Stämme der Gattung *Sorangium* bei. Hierbei unterscheiden sich die Methoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die bisher einzig beschriebene Art der Gattung, *S. cellulosum*, weiter aufzuschlüsseln. Diese sogenannte taxonomische Auflösung (s. Abb. 44) ist am geringsten bei den phänotypischen Analysemethoden wie der Farbe der Zellmasse und der Fruchtkörper, sowie der Produktion der Sekundärmetaboliten.

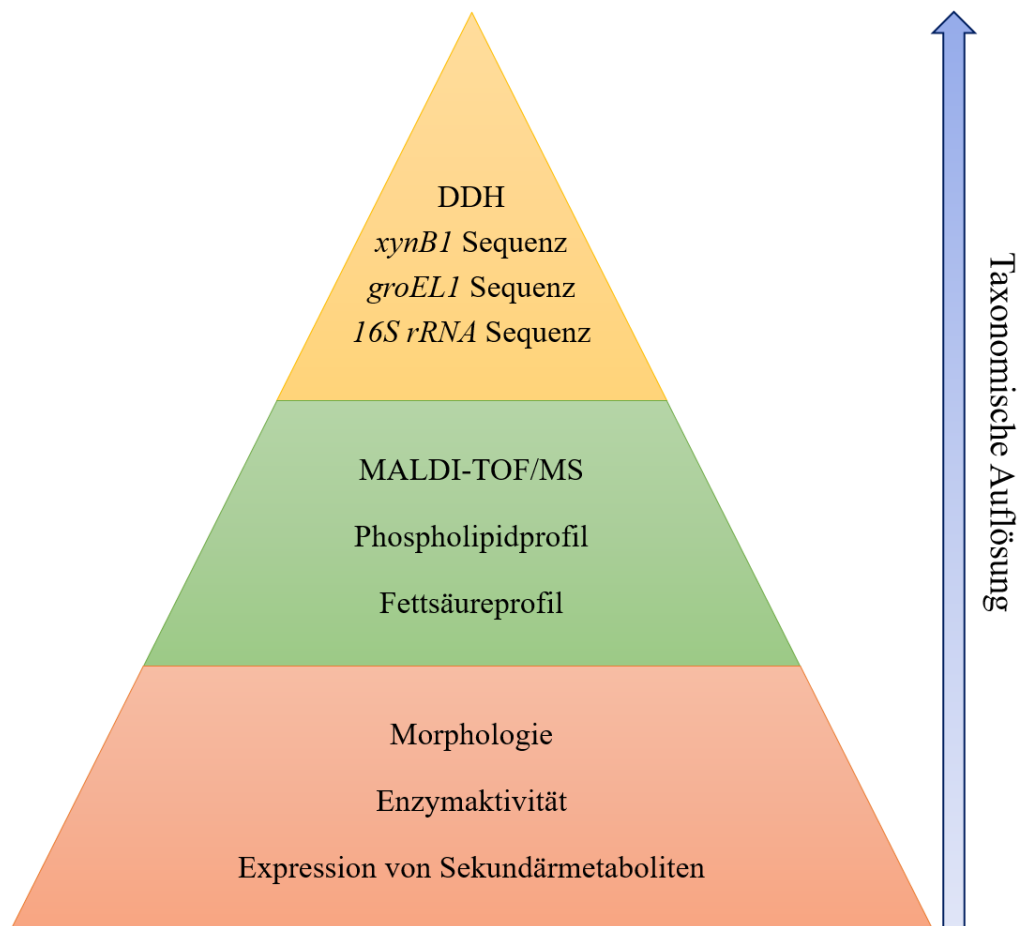


Abbildung 45 Schematische Darstellung der taxonomischen Auflösung unterschiedlicher Methoden zur phylogenetischen Einordnung.

Diese Parameter können durch Medienzusammensetzung, Temperatur und vielen anderen biotischen und abiotischen Faktoren beeinflusst werden. Dies gilt auch für die Enzymaktivität und die damit verbundenen Ergebnisse des Enzymaktivitätstest APIZYM®. Trotz standardisierter Testdurchführung kann die Expression unterschiedlicher Enzyme, je nach Wachstumsphase eines Isolates beeinflusst sein. Dies verringert die Aussagekraft dieser Methode.

Die Fettsäure- und Phospholipidanalyse muss ebenfalls unter stark reproduzierbaren Bedingungen stattfinden, um fehlerbedingte Abweichungen zu vermeiden. Es handelt sich bei diesen Methoden um die Analyse von Expressionsprodukten auf makromolekularer Ebene. Wie bei den Enzymen, kann auch hier die Expression durch viele äußere Faktoren beeinflusst werden. Bei der MALDI-TOF/MS handelt es sich um die Analyse der ribosomalen Proteine, welche hochkonserviert und stabil translatiert werden (Karas und Hillenkamp 1988). Trotz der damit verbundenen geringeren Anfälligkeit durch Kultivierungsmethoden, kommt das

Auflösungsvermögen dieser Methode bezogen auf die Gattung *Sorangium* bei der Speziesdefinition an ihre Grenzen. MALDI-TOF/MS ist in der Lage, Untergruppen innerhalb einer Spezies zu definieren. Dies ist jedoch nur unter bestimmten genetischen Voraussetzungen der Stämme möglich und die Zuverlässigkeit dieser Differenzierung variiert somit bezogen auf unterschiedliche, prokaryotische Gattungen. Es müssen genetische Unterschiede in einem ausreichenden Maßstab vorhanden sein. Bei einer zu hohen Ähnlichkeit des 16S rRNA-Gens ist eine Klassifizierung mittels MALDI-TOF/MS nicht mehr zielführend (Schumann und Maier 2014). Aus diesen Gründen werden die genotypischen Untersuchungen von Bakterienstämmen als verlässlichste angesehen.

Zusammen mit den phänotypischen, chemotypischen und genotypischen Methoden bietet sich ein dreidimensionales Bild der phylogenetischen Einordnung eines Stammes. Die Sequenzierung von hochkonservierten Genen wie dem Zellulase Gen *xynBI*, dem Chaperon *groELI* und dem 16S rRNA-Gen bietet einen direkten Vergleich zwischen den untersuchten Stämmen auf genetischer Ebene. Die enthaltenen phylogenetischen Stammbäume können in Kladen unterteilt werden, aus denen wiederum Typstämme bestimmt werden. Die derzeit gängigste Methode zur Bestimmung einer Art ist die DDH. Diese wird jedoch zunehmend abgelöst durch andere genotypische Untersuchungen, wie der Vollsequenzierung und den damit verbundenen Clusteranalysen.

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden belegen, dass die Spezies *S. cellulosum* in mehrere Spezies unterteilt werden kann. Eine weitere Möglichkeit zur Validierung dieser neuen Arten bietet die Vollsequenzierung der Genome. Die Vollgenomsequenzierung eröffnet Vergleichsmöglichkeiten zwischen weiteren hochkonservierten Genen und kompletter Gencluster. Im Hinblick darauf, dass die Genomgröße der 73 untersuchten Stämme zwischen 9000 und 16000 kb variiert (Prof. Dr. U. Nübel, unveröffentlicht), bietet die Vollsequenzierung die Möglichkeit einer sehr spezifischen Charakterisierung der Stämme. Zusätzlich ist es sinnvoll, die putativen Typstämme mittels einer DDH untereinander ebenfalls zu vergleichen. Um das in dieser Arbeit festgestellte niedrige Auflösungsvermögen der MALDI-TOF/MS zu umgehen, kann für die Einteilung der Mitglieder der Gattung *Sorangium* ein automatisches Ribotyping mittels Riboprinter® durchgeführt werden. Hierbei werden ribosomale DNA Sequenzen von Bakterienstämmen mittels spezifischer Enzyme fragmentiert. Das auf diese Art generierte Fragmentierungsmuster ist auch für sehr nahverwandte Stämme innerhalb einer Art individuell und kann somit zur phylogenetischen Einordnung eines Stammes beitragen (Schumann und Pukall 2013). Eine weitere, unter Taxonomen häufig angewandte, Methode für eine valide, genotypische Klassifizierung von Bakterienstämmen ist das Multi-Locus-Sequenz-Typisierungsverfahren (MLST, *multi-locus sequence typing*). Hierbei werden 400-500 bp lange Fragmente mehrerer, hochkonservierter Housekeeping-Gene amplifiziert und sequenziert. Dies führt zu einem, für jeden Bakterienstamm spezifischen Allelprofil, das eine phylogenetische Abgrenzung zu anderen Stämmen untermauern kann (Das *et al.* 2014, Larsen *et al.* 2012). Diese Methode bietet bei Myxobakterien aufgrund der großen Genome viele Möglichkeiten, sodass auch Gene für die Sekundärmetabolitproduktion für das Allelprofil genutzt werden können. Aufgrund der langwierigen Kultivierung von *Sorangium*, sowie des komplexen Lebenszyklus und die damit verbundene Variabilität bezüglich der Expression von Proteinen, bieten sich für die Klassifizierung sequenzbasierte Methoden auf genomischer Ebene besonders an.

6. Literaturverzeichnis

Awal RP, Garcia R, Gemperlein K, Wink J, Kunwar B, Parajuli N, Müller R (2017) *Vitiosangium cumulatum* gen. nov., sp. nov. and *Vitiosangium subalbum* sp. nov., soil myxobacteria, and emended descriptions of the genera *Archangium* and *Angiococcus*, and of the family *Cystobacteraceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67:1422-143.

Baumann S, Herrmann J, Raju R, Steinmetz H, Mohr KI, Hüttel S, Harmrolfs K, Stadler M, Müller R (2014) Cystobactamids: myxobacterial topoisomerase inhibitors exhibiting potent antibacterial activity *Angew Chem Int Ed Engl.* 53: 14605-14609.

Berod L, Friedrich C, Nandan A, Freitag J, Hagemann S, Harmrolfs K, Sandouk A, Hesse C, Castro CN, Bähre H, Tschirner SK, Gorinski N, Gohmert M, Mayer CT, Huehn J, Ponimaskin E, Abraham WR, Müller R, Lochner M, Sparwasser T (2014) De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat Med.* 20: 1327-1333.

Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P, Swings J (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev.* 29(2):147-67.

Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, Minnikin DE (1977) Distribution of menachinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 100:221-230.

Collins MD, Jones D (1980)

Lipids in the Classification and Identification of Coryneform Bacteria Containing Peptidoglycans Based on 2, 4-diaminobutyric Acid. *J Appl Bacteriol* 48:459-470.

Colwell RR (1970) Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 104:410-433.

Connor DT, Greenough RC, Strandtmann M (1977) W-7783, a unique antifungal antibiotic. *J Org Chem.* 42: 3664-3669.

Corominas-Faja B, Cuyàs E, Gumuzio J, Bosch-Barrera J, Leis O, Martin ÁG, Menendez JA (2014) Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses self-renewal growth of cancer stem cells, *Oncotarget* 5: 8306-8316.

Das S, Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S (2014) Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods*. 103:80-100.

Deloger M, El Karoui M, Petit MA (2009) A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *J Bacteriol*. 2009 191:91-99.

Garcia R, Pistorius D, Stadler M, Müller R (2011) Fatty acid-related phylogeny of Myxobacteria as an approach to discover polyunsaturated omega-3/6 fatty acids. *J of Bacteriology* 139: 1930-1942.

Gemperlein K, Zipf G, Bernauer HS, Müller R, Wenzel SC (2016) Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for production of docosahexaenoic acid based on a myxobacterial PUFA synthase. *Metab* 33: 98-108.

Gerth K, Bedorf N, Irschik H, Höfle G, Reichenbach H (1994) The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *The Journal of Antibiotics* Vol. 47: 23-31.

Gerth K, Bedorf N, Irschik H, Höfle G, Reichenbach H (1996) Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics* Vol. 49: 560-563.

Gerth K, Pradella S, Perlova O, Beyer S, Müller R (2003) Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities--past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J Biotechnol* 106: 233-53.

Gillis M, Vandamme P, De Vos P, Swings J, Kersters K (2001). Polyphasic taxonomy. In G. M. Garrity, D. R. Boone, & R. W. Castenholz (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 1: the Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria, pp. 43–48). New York, NY, USA: Springer.

Goldman BS, Nierman WC, Kaiser D, Slater SC, Durkin AS, Eisen JA, Ronning CM, Barbazuk WB, Blanchard M, Field C, Halling C, Hinkle G, Iartchuk O, Kim HS, Mackenzie C, Madupu R, Miller N, Shvartsbeyn A, Sullivan SA, Vaudin M, Wiegand R, Kaplan HB (2006) Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15200-15205.

Grabley S, Thiericke R (1999) The impact of natural products on drug discovery. *Drug discovery from Nature*. Springer-Verlag, 3-37.

Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57:81-91.

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol*. 63, 3233–3241.

Humble M W, King A, Phillips I (1977) API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J Clin Pathol*. 30: 275–277.

Irschik H, Schummer D, Höfle G, Reichenbach H, Steinmetz H, Jansen R (2007) Etnangien, a macrolide-polyene antibiotic from *Sorangium cellulosum* that inhibits nucleic acid polymerases. *J Nat Prod* 70: 1060-1063.

Jiang DM, Zhao L, Zhang CY, Li J, Xia ZJ, Wang J, Wu ZH, Li YZ (2008) Taxonomic analysis of *Sorangium* strains based on HSP60 and 16S rRNA gene sequences and morphology. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2654-2659.

Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons Anal Chem. 15;60:2299-301.

Kroppenstedt RM (1979) Chromatographische Identifizierung von Mikroorganismen , dargestellt am Beispiel der Actinomyceten. Kontakte Merck. 2:12-21.

Kunze B, Kemmer T, Höfle G, Reichenbach H (1984) Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 37: 454-461.

Kunze B, Höfle G, Reichenbach H (1987) The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 40: 258-265.

Kunze B, Jansen R, Höfle G, Reichenbach H (1994) Crocacin, a new electron transport inhibitor from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 47: 881-886.

Kunze B, Jansen R, Sasse F, Höfle G, Reichenbach H. (1995) Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 48: 1262-1266.

Kunze B, Reichenbach H, Müller R, Höfle G. (2005) Aurafuron A and B, new bioactive polyketides from *Stigmatella aurantiaca* and *Archangium gephyra* (myxobacteria). Fermentation, isolation, physico-chemical properties, structure and biological activity. J Antibiot (Tokyo) 58: 244-251.

Kutzner HJ, Kroppenstedt RM, Korn-Wendisch F (1986) Methoden zur Untersuchung von Streptomyceten und einigen anderen Actinomyceten. 4. Report of the Institute for Microbiology, Technical University Darmstadt and German Culture Collection (DSMZ).

Landwehr, W., Wolf, C., Wink, J. (2016) Actinobacteria and Myxobacteria – Two of the most important bacterial resources for novel antibiotics. In: How to overcome the antibiotic crisis – Facts, challenges, technologies & future perspective (273-302), Stadler M, Dersch P, Current topics in Microbiology and Immunology, Springer.

Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbag L, Sicheritz-Ponten T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lundo O (2012) Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol 50: 1355-1361.

Lee H, Youn J, Cho K (2010) Phylogenetic analysis of *Sorangium cellulosum* strains based on cellulase gene sequences. Korean J Microbiol 39:20-28.

Lee C, An D, Lee H, Cho K (2012) Correlation between *Sorangium cellulosum* subgroups and their potential for secondary metabolite production. J Microbiol Biotechnol. 23:297-303.

Li SG, Zhao L, Han K, Li PF, Li ZF, Hu W, Liu H, Wu ZH, Li YZ (2013) Diversity of epothilone producers among *Sorangium* strains in producer-positive soil habitats. Microb Biotechnol. 7:130-141.

Lind E, Ursing J (1986) Clinical strains of *Enterobacter agglomerans* (synonyms, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) identified by DNA-DNA-hybridisation. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B 94: 205-213.

Link HF (1809) Observations in Ordines plantarum naturales. Dissertatio prima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos. Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin Magazin für die neuesten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde 3,3-42+2.

Martinez JP, Hinkelmann B, Fleta-Soriano E, Steinmetz H, Jansen R, Diez J, Frank R, Sasse F, Meyerhans A (2013) Identification of myxobacteria-derived HIV inhibitors by a high-throughput two-step infectivity assay. Microb Cell Fact 12: 85.

Meier-Kolthoff JP, Göker M, Spröer C, Klenk HP (2013) When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? Arch Microbiol. 195:413-8.

Minnikin DE, Collins MD, Goodfellow W (1979) Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J. Appl. Microbiol.* 47: 87–95.

Moore ER, Mihaylova SA, Vandamme P, Krichevsky MI, Dijkshoorn L (2010) Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol.* 161:430-438.

Müller R, Wink J (2014) Future potential for anti-infectives from bacteria - how to exploit biodiversity and genomic potential, *Int J Med Microbiol* 304: 3-13.

Ojika M, Suzuki Y, Tsukamoto A, Sakagami Y, Fudou R, Yoshimura T, Yamanaka S (1998) Cystothiazoles A and B, new bithiazole-type antibiotics from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*, *J Antibiot (Tokyo)* 51: 275-281.

Oren A, Garrity GM (2014) Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 106:43-56.

Oxford AE and Singh BN (1946) Factors Contributing to the Bacteriolytic Effect of Species of Myxococci upon Viable Eubacteria. *Nature* 158:745.

Oxford AE (1947) Observations concerning the growth and metabolic activities of myxococci in a simple protein-free liquid medium. *J Bacteriol* 53: 129-138.

Papke RT, Zhaxybayeva O, Feil EJ, Sommerfeld K, Muise D, Doolittle WF. (2007) Searching for species in haloarchaea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:14092-14097

Reichenbach H (1983) A simple method for the purification of myxobacteria. *J Microbiol Methods* 1: 77-79.

Reichenbach H, Gerth K, Irschik H, Kunze B, Höfle G (1988) Myxobacteria: a source of new antibiotics. *Trends Biotechnol* 6:115-121.

Reichenbach H and Dworkin M (1991) *The Prokaryotes (Vol.4)*, (pp. 3415-3487) Springer, New York.

Reichenbach H, Dworkin M, Shinkets LJ (2006) The Prokaryotes (Vol.7), (pp. 31-115), Springer, Berlin.

Reichenbach H and Höfle G (2008), Discovery and development of the epothilones: a novel class of antineoplastic drugs, *Drugs R D*. 9:1-10.

Richter M, Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 19126-19131.

Ringel SM, Greenough RC, Roemer S (1977) Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic. *J Antibiot* 30: 371-375.

Sasse F, Steinmetz H, Höfle G, Reichenbach H (1993) Rhizopodin, a new compound from *Myxococcus stipitatus* (myxobacteria) causes formation of rhizopodia-like structures in animal cell cultures. Production, isolation, physico-chemical and biological properties, *J Antibiot* (Tokyo) 1993 46: 741-748.

Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer MO, Bartels D, Bekel T, Beyer S, Bode E, Bode HB, Bolten CJ, Choudhuri JV, Doss S, Elnakady YA, Frank B, Gaigalat L, Goesmann A, Groeger C, Gross F, Jelsbak L, Jelsbak L, Kalinowski J, Kegler C, Knauber T, Konietzny S, Kopp M, Krause L, Krug D, Linke B, Mahmud T, Martinez-Arias R, McHardy AC, Merai M, Meyer F, Mormann S, Muñoz-Dorado J, Perez J, Pradella S, Rachid S, Raddatz G, Rosenau F, Rückert C, Sasse F, Scharfe M, Schuster SC, Suen G, Treuner-Lange A, Velicer GJ, Vorhölter FJ, Weissman KJ, Welch RD, Wenzel SC, Whitworth DE, Wilhelm S, Wittmann C, Blöcker H, Pühler A, Müller R (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol* 25:1281-1289.

Schreurs M, Van Dijk TH, Gerding A, Havinga R, Reijngoud DJ, Kuipers F (2009) Soraphen, an inhibitor of the acetyl-CoA carboxylase system, improves peripheral insulin sensitivity in mice fed a high-fat diet. *Diabetes Obes Metab* 11: 987–991.

Schumann P und Maier T (2014) MALDI-TOF mass spectrometry applied to classification and identification of bacteria. *Meth Microbiol* 41: 275-306.

Schumann P und Pukall R (2013) The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *Syst Appl Microbiol* 36: 369-375.

Shimkets L J, Dworkin M, Reichbach H (2006) The myxobacteria, 3rd ed. Springer-Verlag, New York.

Schubert S, Wiesner A (2010) MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik, *Biospektrum* 7:760-762.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52:1043-1047.

Stakebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards *Microbiol. Today*, pp:153-155.

Surup F, Viehriig K, Mohr KI, Herrmann J, Jansen R, Müller R (2014) Disciformycins A and B: 12-membered macrolide glycoside antibiotics from the myxobacterium *Pyxidicoccus fallax* active against multiresistant staphylococci. *Angew Chem Int Ed Engl*. 53: 13588-13591.

Sutcliffe IC, Trujillo ME, Goodfellow M (2012) A call to arms for systematists: revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 101:13-20.

Suzuki K, Goodfellow M, O'Donnell AG (1993) Cell envelopes and classification, S. 195–250. In M. Goodfellow und A. G. O'Donnell, *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press Ltd., London.

Thaxter R (1892) On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot Gaz* 17: 389-406.

van Esbroeck M, Vandamme P, Falsen E, Vancanneyt M, Moore E, Pot B, Gavini F, Kersters K, Goossens H (1996) Polyphasic approach to the classification and identification of *Gardnerella vaginalis* and unidentified *Gardnerella vaginalis*-like coryneforms present in bacterial vaginosis. *Int J Syst Bacteriol.* 46:675-682.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60:407-38.

Vandamme P, Peeters C (2014) Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:57-65.

Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P (2009) Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:102-111.

Weissmann KJ, Müller R (2009) A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg Med Chem* 17: 2121-2136.

Welker M und Moore ERB (2011) Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 34: 2-11.

Wenzel SC, Müller R (2009) The impact of genomics on the exploitation of the myxobacterial secondary metabolome. *Nat Prod Rep* 26: 1385-1407.

Wink J, Moradi A, Ebrahimipour GH, Mohr KI, Kämpfer P, Glaeser S, Hennessen F, Gemperlein K, Awal RP, Wolf C, Müller R (2017) *Racemicystis iranensis* sp. nov., a novel myxobacterium from Iranian soil. *IJSEM* 67: 472-478.

Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51:221-71.

Ziemke F, Höfle MG, Lalucat J, Rosselló-Mora R (1998) Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella Baltica* sp. Nov., Int J of Sys Bact 48:179-186.

7. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Supervisor Joachim Wink für die Möglichkeit dieser Dissertation, das interessante Thema und die Hilfestellung bedanken. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Sterinert für die Übernahme der Mentorenschaft und des Koreferats.

Den Mitgliedern meines Thesis Committees, PD Joachim Wink, Prof. Dr. Michael Steinert, Prof. Dr. Rolf Müller und PD Peter Schumann für die hilfreichen Diskussionen und die Anregungen bezüglich dieser Arbeit möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Ich danke Dr. Katja Gemperlein und Fabienne Hennessen vom HIPS in Saarbrücken für die viele Hilfe bei der Fettsäureanalyse und der MALDI-TOF-MS Messungen und die nette Zusammenarbeit. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Nübel für Ideen, die interessante und freundliche Zusammenarbeit, die Bereitstellung der Sequenzdaten und die Möglichkeit, die Daten an der DSMZ zu bearbeiten.

Karin Martin vom HKI Jena bin ich für die Möglichkeit, die Phospholipidanalyse am HKI, mit viel freundlicher Unterstützung ihrerseits, durchzuführen.

Ich bedanke mich bei Dr. Raimo Franke für die bioinformatische Unterstützung.

Ein ganz großer und herzlicher Dank gilt der MISG, die mich ohne zu zögern sehr liebevoll aufgenommen und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke an Kathrin, Sabrina, Romy, Jola, Wera, Lucky, Chandra, Aileen, Peter, Patrick, Simon, Rina und Maja für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls ein besonderer Dank gilt Wiebke, Klaus, Steffi, Birte und Cäcilia. Ohne Euch hätte ich die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht geschafft. Neben den besten Kollegen die man haben kann seid ihr ebenso Freunde für mich geworden. Ihr habt mir praktisch und theoretisch sehr geholfen, ward immer für mich da und hattet immer ein offenes Ohr.

Danke an die Graduiertenschule, insbesondere Sabine Kirchhoff für die Motivation, das Verständnis und die Hilfe.

Auch bei meiner ehemaligen Arbeitsgruppe möchte ich mich bedanken. Insbesondere Kathrin, Freddy und Helena möchte ich meinen Dank aussprechen.

Ich bedanke mich bei dem Betriebsratsvorsitzenden John Aubert für die Unterstützung in schwierigen Zeiten.

Ich danke meiner Familie, meinen Freunden und meiner besten Freundin Meike für ihre unermessliche Geduld mit mir. Ihr habt mich in der ganzen Zeit bei meinem Weg begleitet, unterstützt und motiviert.

